

MENSAJE BIOQUÍMICO



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

EDITORES: I.P. del ARENAL MENA, A. CEA BONILLA, H.
RIVEROS ROSAS, E. VÁZQUEZ-CONTRERAS.

EDITORIAL

Estimado lector, es un placer para el comité organizador del XXIX Taller de actualización Bioquímica, presentarle el vigésimo sexto volumen del libro *Mensaje Bioquímico*, publicación que anualmente edita y publica el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Dicha publicación, en honor a la verdad, no sería posible sin la generosa contribución de los ponentes del Taller de Actualización Bioquímica, quienes preparan con gran esmero, una revisión especialmente elaborada para ser publicada a manera de memorias, de las presentaciones desarrolladas durante el Taller. Así, se trata de trabajos de actualización, de gran calidad científica, y que nos permiten exclamar con orgullo a lo largo de más de 25 años, que constituyen la mejor colección de trabajos en el área de la bioquímica, publicada en idioma español.

El presente volumen es especialmente significativo, no solo por la calidad de los ponentes que aceptaron participar este año en el taller, sino también porque se abre una nueva etapa del *Mensaje Bioquímico*, ya que por primera vez, tendremos dos ediciones del mismo, una impresa que se distribuye principalmente entre todos los asistentes del Taller de Actualización Bioquímica, y una electrónica, la cual se podrá acceder libremente a través de la página del Departamento de Bioquímica (<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>). Esta última edición, era ya una necesidad apremiante en esta nueva era de globalización e internet, que nos permite dar la difusión que merecen, las excelentes revisiones que depositan en nuestras manos los ponentes del Taller de Actualización Bioquímica, y nos brinda la oportunidad de lograr un impacto mayor, no solo entre los asistentes al taller, sino potencialmente en toda la comunidad hispanoamericana interesada en la Bioquímica, con la cual compartiremos ahora, el fruto más selecto de nuestra reunión, el "*Mensaje Bioquímico*."

Por otra parte, es importante destacar también, la gran diversidad de temas que se han abordado a lo largo de las diferentes ediciones del "Mensaje Bioquímico", que van desde la salud pública, la ingeniería de proteínas, la contaminación ambiental, el origen de la vida, etc. lo que no hace más que enfatizar, el notable alcance que tiene la Bioquímica moderna en nuestros días. Así, podemos afirmar también, casi con certeza, que actualmente no existe área dentro de la amplia gama de las ciencias biológicas y médicas, que no tengan que recurrir en su explicación última, a las bases moleculares que determinan los fenómenos naturales. Es por esto que, la Bioquímica actual (como madre de la biología molecular), ha terminado por convertirse en la herramienta básica con la cual investigadores de áreas muy disímiles, han encontrado un mismo punto de convergencia, a partir del cual, todo adquiere sentido.

El volumen XXVI del *Mensaje Bioquímico* no podía ser la excepción, y en él se abarca también una gran diversidad de temas. Así, el Dr. Xavier Soberón (Director del

Instituto de Biotecnología), abre la reunión, exponiendo con gran sencillez y claridad los principios que gobiernan el plegamiento y evolución de las proteínas, los avances en la evolución dirigida y la ingeniería de proteínas, y su aplicación en el desarrollo de una industria química más limpia y benigna con el entorno.

Por otro lado, el Dr. Wilhelm Hansberg, del Instituto de Fisiología Celular, nos preparó una elegante y documentada revisión sobre la Biología de las especies de oxígeno reactivas, la cual abarca desde los aspectos más básicos de la fisicoquímica del oxígeno y sus derivados, hasta sus mecanismos de reacción con las moléculas biológicas, incluyendo por supuesto, un apartado muy completo sobre los múltiples sistemas antioxidantes con que cuentan los seres vivos. La revisión remata exponiendo el papel del oxígeno en la proliferación y diferenciación celular, uno de los aspectos más excitantes de la biología del oxígeno que se ha desarrollado en los últimos años.

El Dr. Alejandro Fernández-Velasco, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, preparó una muy atractiva revisión sobre las patologías asociadas al plegamiento anómalo de proteínas, ahora denominadas como plegopatías, entre las que destacan, la fibrosis quística, las encefalopatías espongiiformes, y muy probablemente el Alzheimer, entre otras. Este trabajo corresponde a una extensión natural de la revisión previamente elaborada por Clorinda Arias y Xavier Mungarro sobre Alzheimer (Vol. XXV del *Mensaje Bioquímico*). De esta forma, los autores revisan ahora los factores termodinámicos y cinéticos que determinan el plegamiento de las proteínas, y analizan la información disponible sobre las plegopatías más notables, así como los mecanismos de que disponen las células para evitar la agregación de proteínas.

La Dra. Nancy Carrasco por su parte, desde el Albert Einstein College of Medicine en Nueva York, nos comparte una concisa revisión del transportador de yodo, describiendo los últimos avances en la regulación y caracterización a nivel molecular de este transportador, y nos permite vislumbrar el impacto potencial de este transportador en el tratamiento de algunos tipos de cáncer mediante el empleo de pequeñas dosis de yodo radioactivo. El Dr. Julio Reyes Leyva, del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, nos ilustra los últimos avances en los mecanismos moleculares de la patogenicidad viral, empleando como paradigma el *rubulavirus porcino*, una enfermedad viral emergente, descrita por primera vez en 1980, en granjas porcinas de la Piedad, Michoacán. Así, mediante una detallada y cuidadosa revisión, los autores nos sumergen en la frontera entre la Bioquímica y la Inmunología, simbiosis obligada para tratar de comprender la patogenicidad viral.

El Dr. Salomón Bartnicki-García, que es profesor emérito por la Universidad de Rutgers-- y actualmente se encuentra laborando en el CICESE, nos presenta un delicioso y ameno relato sobre la morfogénesis en los hongos, en donde con una claridad poco usual, nos contagia el tremendo placer que entraña el quehacer científico.

Como obsequio final a nuestros lectores, se incluye en el presente volumen, el trabajo expuesto por la Dra. Herminia Pasantes, investigador emérito por el Instituto de Fisiología Celular, quién generosamente aceptó participar fuera de programa, en el pasado

XXVIII Taller de Actualización Bioquímica, presentando una conferencia realmente sobresaliente, sobre la regulación del volumen celular. El trabajo escrito por la Dra. Pasantes, representa la respuesta a las numerosas solicitudes que pidieron incluir en el *Mensaje Bioquímico*, su ponencia.

Estamos seguros que muchos de los trabajos aquí plasmados, se convertirán en referencia obligada para todos los estudiantes de habla hispana, interesados en la Bioquímica. Para los profesores, esperamos que estas revisiones, contribuyan a un mejor desarrollo del trabajo en clase. Como editores del *Mensaje Bioquímico*, hemos hecho nuestro mejor esfuerzo por lograr que este material tenga la mayor difusión posible y este presentado en la forma más adecuada y atractiva. El tremendo esfuerzo desarrollado por los autores nos exigió, por nuestra parte, a desarrollar un esfuerzo editorial equivalente.

Por último, queremos hacer patente nuestro agradecimiento a la Dra. Ana María López Colome (jefa del Departamento de Bioquímica) y el Dr. Alejandro Cravioto (Director de la Facultad de Medicina), por el apoyo, que como ya es tradición, nos han brindado año con año, para la realización de éste Taller; y especialmente a Rafael Cauduro, extraordinario pintor mexicano, maestro de la pintura hiperrealista contemporánea, quién personalmente nos autorizó para utilizar una de sus obras, la que engalana la portada de éste volumen, así como los carteles promocionales de la semana de la educación Bioquímica 2002.

Agosto del 2002

Héctor Riveros Rosas



Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez-Contreras E, (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVI**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2002).

(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LA INGENIERIA GENÉTICA Y UN CAMPO DE APLICACIÓN: LA BIOCATÁLISIS Y LA INDUSTRIA QUÍMICA LIMPIA.

Xavier Soberón Mainero

Instituto de Biotecnología, UNAM

Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210. México

soberon@ibt.unam.mx

Introducción

A partir del surgimiento de las técnicas de DNA recombinante, hace cerca de 30 años, se inició una revolución en los enfoques utilizados para estudiar prácticamente todos los fenómenos biológicos. El estudio de las proteínas no fue la excepción. La posibilidad creciente de aislar, caracterizar y, especialmente, modificar genes, fue dando origen a formas cada vez más poderosas y sofisticadas de indagar la relación entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas. Asimismo, las herramientas y el conocimiento sobre estos sistemas han potenciado en gran medida la posibilidad de utilizarlos con fines tecnológicos. En este trabajo se presenta una visión general sobre algunas de las principales áreas de investigación en proteínas y sobre las posibilidades de su aplicación, especialmente en el campo de la biocatálisis.

Además, se proveen ejemplos a partir de proyectos de investigación propios de nuestro laboratorio, con especial énfasis en ingeniería de proteínas, a partir del enfoque de evolución dirigida, como medio para lograr modificar las propiedades enzimáticas.

La investigación contemporánea en proteínas: principales preguntas

Al hablar de ingeniería de proteínas, nos estamos refiriendo a la modificación racional y utilitaria de estas macromoléculas, centrales en todas las transacciones biológicas. Con gran intuición, el químico holandés Mulder fue quien dio nombre a estas sustancias en 1838, utilizando la raíz griega "protos", que significa: primordial o "de la mayor importancia". No es de sorprender, entonces, que la investigación contemporánea alrededor de las proteínas se mantenga extremadamente activa. Evidentemente, la capacidad de modificar un sistema está directamente relacionada con el conocimiento que tenemos de ese sistema. Por eso se inicia este artículo revisando, de manera somera, algunas de las preguntas centrales que se formulan actualmente en este campo.

La descripción de la composición química de las proteínas es, como sabemos, muy sencilla: son polímeros lineales compuestos por 20 diferentes aminoácidos, cuya secuencia determina su identidad química y, en última instancia su función. Sin embargo, la función de las proteínas, su eficiencia y especificidad de interacción, dependen más directamente de la conformación que adoptan, es decir, que las contorsiones espontáneas de la cadena lineal de aminoácidos, en lo que se conoce como estructura terciaria o conformación nativa. Una molécula típica de proteína consta de varios cientos de aminoácidos, por lo que resulta ser un complejísimo sistema con varios miles de átomos. La determinación experimental de la posición relativa de estos átomos en el espacio requirió el desarrollo y adaptación de las técnicas de cristalografía de rayos X. La solución de la primera estructura de proteína tomó a Max Perutz más de 20 años. Hoy en día la solución de una estructura nueva puede ocurrir en unos cuantos meses (o hasta semanas, ver más adelante), pero sigue constituyendo un logro extraordinario, por ser técnicas de gran belleza que rinden gran cantidad de información. Más recientemente se ha incorporado la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) al arsenal de herramientas para la determinación de estructuras proteicas. Producto de los esfuerzos de cristalógrafos y espectroscopistas, disponemos hoy en día de más de tres mil estructuras tridimensionales independientes, con las que podemos realizar estudios comparativos y derivar nociones generales sobre la arquitectura de estas biomoléculas, así como acercarnos desde otra perspectiva al estudio de la evolución molecular. A pesar de todo esto, las proteínas son sistemas moleculares tan complejos, que todo este conocimiento no es suficiente para predecir, a partir de la secuencia de aminoácidos, la estructura tridimensional.

Plegamiento de proteínas.

La investigación en este campo se refiere al proceso por el cual una proteína naciente, o una desnaturalizada, adopta su conformación nativa. Destacan dos grandes aspectos o preguntas, que podríamos identificar con la termodinámica y la cinética, respectivamente, del plegamiento de proteínas: ¿Cuál es la naturaleza y la magnitud de las interacciones no covalentes que determinan cómo se conforma una proteína?; ¿En qué orden o secuencia temporal se establecen estas interacciones, de tal manera que las proteínas adquieran su conformación nativa en tiempos compatibles con su función biológica?

Respecto a la primera pregunta, es claro que al aproximarnos a su solución, contaremos con la herramienta adecuada para analizar las estructuras determinadas experimentalmente, así como sus interacciones con otras proteínas y ligandos pequeños. Adicionalmente, responder esta pregunta es una condición necesaria para poder predecir, con base en principios fundamentales, la conformación nativa de una proteína a partir de su secuencia. Asimismo, como se trata en otro de los capítulos de este volumen, (véase Cháñez-Cárdenas *et al.*, pp 73-97) el plegamiento de proteínas subyace la causa de algunas importantes enfermedades.

La segunda pregunta surge de la observación que hoy llamamos la paradoja de Levinthal (1). Si consideramos que cada aminoácido puede adoptar 10 conformaciones distintas (un cálculo conservador), entonces para una proteína pequeña, de 100 aminoácidos, existen al menos 10^{100} diferentes conformaciones para agotar su espacio conformacional. Este es un número astronómico de conformaciones, que una proteína no puede “visitar” en un tiempo equivalente a la edad del universo, pero la mayoría de las proteínas se pliegan (adquieren su conformación nativa) en intervalos que van desde milisegundos hasta unos cuantos segundos. La búsqueda de la solución para esta paradoja constituye el activo campo del plegamiento de proteínas. Forzosamente deben existir vías de plegamiento o etapas en las que ciertas interacciones, que se forman rápido, condicionan las etapas subsecuentes (2). Nuevamente, la comprensión de este proceso tiene grandes implicaciones y constituye una herramienta promisoría (quizá indispensable) para lograr la predicción de la estructura a partir de la secuencia, atendiendo a principios fundamentales.

Entre estos principios, debemos observar la existencia de grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno en el enlace peptídico. Estos puentes de hidrógeno deben quedar establecidos en la estructura nativa (ya que, por supuesto, están establecidos por interacción con el agua en una estructura desplegada). La manera más sencilla de lograr esto es con la formación de estructuras periódicas, como las alfa hélices y las láminas beta. Además, existen aminoácidos hidrófobos e hidrofílicos, grandes y chicos, capaces de formar puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Entre todas las interacciones posibles para las cadenas laterales de los aminoácidos, existe buena evidencia para suponer que la más importante para determinar la estructura proteica es la interacción hidrófoba. Podemos imaginar a una cadena polipeptídica como un largo collar que contiene en algunas de sus posiciones

gotitas de aceite, y en otras, entidades solubles en agua. Al colocar tal filamento en agua, las gotitas de aceite tenderían a colapsarse para formar gotas más grandes, contorsionando en consecuencia a la cadena. Las interacciones hidrófobas serían la fuerza motriz de la contorsión, pero implicarían el ocultamiento de los enlaces peptídicos, por lo que un colapso hidrófobo en el que se mantienen los puentes de hidrógeno, por medio de estructuras secundarias, sería más estable. Asimismo, las interacciones en el interior de la proteína nativa contribuirán a su estabilidad en la medida en que “embonen” óptimamente, es decir que dejen pocos espacios vacíos. Finalmente, la presencia de cadenas laterales que completan puentes de hidrógeno que no se pudieron formar en la estructura secundaria, así como otras que contribuyen a la solubilidad (por ejemplo, quedando con carga electrostática en la superficie), serían otros factores importantes para obtener una estructura nativa específica y estable.

La descripción anterior se refiere a conceptos cualitativos bastante bien aceptados en relación con los parámetros fisicoquímicos que intervienen en el plegamiento de proteínas. Evidentemente, para poder utilizar estos conceptos en el proceso de predicción de la estructura se requiere contar con el componente cuantitativo y preciso de las magnitudes de estos parámetros, aunado a una capacidad sólida de simular el proceso mismo de plegamiento. Por otro lado, se reconoce que la energía libre asociada al plegamiento nativo de la mayoría de las proteínas es de una magnitud relativamente modesta (menos de 15 Kcal/mol), pero que resulta de la diferencia entre un gran número de componentes que contribuyen a desestabilizarla (notablemente una disminución drástica de la entropía de la cadena polipeptídica) y otros que contribuyen a estabilizarla. Así, la suma algebraica de numerosos términos tiene el efecto de amplificar cualquier error sistemático y, en todo caso, de establecer una situación en la que la relación entre el ruido y la señal es poco favorable. En cualquier caso, cabe destacar que la concepción del proceso de plegamiento, es decir, la existencia y naturaleza de los intermediarios que determinan que éste se pueda dar en un tiempo compatible con la vida celular, ha experimentado un progreso sostenido durante las últimas décadas. Por todo lo anterior, se puede anticipar que la solución rigurosa del problema del plegamiento de proteínas se encuentra aún muy distante, y que habremos de conformarnos con descripciones cualitativas y modelos empíricos durante un buen número de años. Como parte del esfuerzo de encontrar soluciones rigurosas, hoy día se encuentran en marcha dos proyectos ambiciosos para abordar el problema, que consisten en la construcción de una supercomputadora (BlueGene) por parte de la empresa IBM y, por otro lado, la creación de un consorcio internacional para coordinar los tiempos muertos de las computadoras personales conectadas a la red Internet, para que procesen en forma distribuida simulaciones realistas del plegamiento de proteínas (<http://folding.stanford.edu/download.html>).

Reconocimiento Molecular y Catálisis.

Las estructuras nativas de las proteínas determinan que la cadena polipeptídica presente arreglos o constelaciones de residuos de aminoácido en posiciones definidas en el espacio tridimensional. Más aún, determinadas regiones de la superficie de una

proteína pueden contener densidades de carga electrostática influenciadas por la estructura completa de la proteína (por ejemplo, por los macro-dipolos presentes en las alfa hélices). Asimismo, la red de interacciones entre los diversos elementos de estructura determinan una mayor o menor flexibilidad en algunos segmentos específicos de la cadena polipeptídica. La superficie de una proteína globular, con sus hendiduras y movimientos locales, constituye un tapiz en el que la naturaleza puede dibujar innumerables patrones. Estos patrones específicos de entidades hidrófobas o con carga electrostática, donadoras oceptoras de puentes de hidrógeno, permiten establecer una complementariedad, en forma y propiedades, con moléculas grandes y pequeñas, es decir, determinan la capacidad de reconocimiento molecular (3). Los mismos principios que explican el plegamiento de las proteínas en sus estructuras nativas son aplicables a las interacciones que definen el reconocimiento específico de otras moléculas.

La flexibilidad inherente a las proteínas constituye un reto importante para el análisis del reconocimiento molecular, en la medida en que puede existir una adecuación inducida (induced fit), en la que la complementariedad de las formas entre una proteína y su ligando no existe de antemano, sino que se establece al darse las primeras interacciones.

En todo caso, los constantes avances en la comprensión, tanto por determinaciones experimentales como por simulación, de las interacciones moleculares auguran una creciente capacidad para utilizar la información estructural de proteínas para comprender también sus interacciones con otras sustancias y como elemento clave para el diseño de fármacos con base en la molécula blanco.

Las proteínas desde el punto de vista evolutivo.

La información de los genes se expresa, primero, de una manera lineal, en la secuencia de las proteínas, de acuerdo con el código genético, pero la función codificada sólo surge de la estructura tridimensional que las proteínas adoptan. Más aún, incluso la estructura en sí misma no revela directamente la función de la proteína, por lo que el problema verdadero de deducir función a partir de secuencia es todavía más complicado.

Afortunadamente, por otra parte, los genes y sus productos son el resultado del proceso evolutivo y, al igual que los organismos, guardan relaciones perfectamente discernibles que revelan la existencia de sus ancestros comunes, incluso de manera cuantificable.

A partir de la enormidad de la combinatoria de secuencias de aminoácidos, es fácil deducir que, por ejemplo, la probabilidad de obtener, por un proceso azaroso, dos secuencias de 100 aminoácidos idénticas es despreciablemente pequeña. Por este mismo principio, la probabilidad de que dos secuencias (no repetitivas) con un parecido detectable, pero no idénticas, hayan surgido independientemente, resulta bajísima en segmentos relativamente largos de proteínas (digamos, 100 aminoácidos) con más de

25% de los residuos idénticos (o bien, 75% de los residuos distintos). Esta noción puede no ser completamente intuitiva, pero subyace uno de los conceptos más poderosos en el análisis funcional de proteínas en la actualidad: la inferencia de la función por homología. Si contamos con la secuencia de una proteína, de la cual desconocemos su función, el primer paso obligado es la inspección de las bases de datos de secuencia, para detectar alguna otra secuencia con suficiente parecido. Si se encuentra tal secuencia, de inmediato podemos inferir que la función de nuestra proteína está relacionada (incluso cercanamente) con la de la proteína homóloga detectada. Se puede decir que hemos resuelto el problema de "predecir" la función, a partir de la secuencia. Y, paradójicamente, esta identificación puede prescindir de la estructura, puesto que tenemos conocimiento funcional de muchas proteínas de las que desconocemos la estructura.

En la actualidad, estos métodos para analizar la secuencia de proteínas (deducida de la secuencia nucleotídica de los genes que las codifican), han cobrado extraordinaria relevancia en el contexto de los proyectos genómicos (4). A partir de la propuesta y puesta en marcha del proyecto del genoma humano se han ido completando, además, las secuencias completas de los genomas de otros muchos organismos, y se dispone así del catálogo completo de los genes que los constituyen. Asimismo, se ha puesto en marcha la conceptualización e implementación de un programa de "genómica estructural", cuya meta es la solución experimental de suficientes proteínas para tener representada la vasta mayoría de las arquitecturas fundamentales existentes en la naturaleza (que se estiman en alrededor de 2000-4000 plegamientos característicos). Este proyecto implica resolver al menos 10,000 nuevas estructuras dentro de un programa de selección cuidadosa de proteínas objetivo, atendiendo a la probabilidad de que éstas representen plegamientos nuevos (5). El enfoque genómico conlleva el desarrollo de técnicas de procesamiento paralelo y masivo de muestras, con lo que los tiempos promedio para la resolución de cada estructura han disminuido y se espera que disminuyan aún más.

En conclusión, podemos observar con satisfacción que la investigación moderna acerca de las proteínas se da con gran énfasis en un contexto clave: el de la evolución, que es el gran principio unificador en biología.

Es indudablemente impresionante la sofisticación, eficiencia y diversidad del repertorio funcional de las proteínas. Pero es tal vez aún más impresionante el comprender que el proceso que dio origen a este repertorio, en el curso de miles de millones de años, es la selección natural. De manera similar al análisis del fenómeno evolutivo a nivel de poblaciones e individuos de diversas especies, los principios básicos de la evolución molecular se consideran razonablemente bien establecidos, pero distamos mucho de una comprensión cabal de los mecanismos específicos que dan mayor sustento y capacidad predictiva a esta teoría.

Un componente bien establecido es el mecanismo de evolución molecular por duplicación de los genes y posterior divergencia. Expresado de manera sucinta, este mecanismo consiste en la duplicación del gene que codifica para una determinada proteína, liberando así una copia de la presión selectiva para la función original,

aportada por la otra copia. A lo largo del tiempo, la copia adicional adquiere modificaciones por diversos mecanismos y, ocasionalmente, resulta una variante cuya actividad, diferente a la original, ofrece alguna ventaja al organismo portador. Existe abundante evidencia, a partir del análisis de las secuencias de proteínas contemporáneas, que demuestra la prevalencia de este mecanismo, particularmente en las etapas más recientes de la evolución molecular. Este es un proceso natural, por medio del cual pequeños cambios sobre una proteína que ya existe pueden generar nuevas actividades.

Un análisis más cuidadoso de las similitudes y diferencias, tanto en el nivel de secuencia como en el estructural de las proteínas contemporáneas sugiere una clasificación jerárquica (Fig. 1): en el máximo grado de similitud se encuentran las proteínas incuestionablemente homólogas (con un origen común virtualmente seguro), cuya función puede ser la misma (ortólogas) o ligeramente diferente (parálogas) (Nótese que esta nomenclatura corresponde a un concepto básico en evolución de proteínas. La homología se refiere al origen común. No es correcto referirse a un determinado grado de homología: dos proteínas son homólogas o no lo son. Si la divergencia en secuencia a partir del ancestro común tienen como consecuencia un cambio en la función, hablamos de proteínas parálogas. Si su función es equivalente, aún cuando difieran también en su secuencia, se les denomina ortólogas. Un ejemplo bien conocido de un sistema así es el de las globinas, que son proteínas transportadoras de oxígeno. La hemoglobina de humano y la de pollo difieren en su secuencia en cierto porcentaje, pero son, desde luego, homólogas, y por tener la misma función se denominan ortólogas. La mioglobina, presente en el músculo, tiene una función y propiedades diferentes, por lo que se le denomina paróloga a la hemoglobina. Todo este sistema proviene de un ancestro común; una globina primitiva).

En este nivel jerárquico se utiliza el término familia y superfamilia. Existen clasificaciones para grados menores de similitud, indetectable a nivel de secuencia, y donde el origen común no puede inferirse con seguridad, pero que se detecta con facilidad en el nivel estructural (y, ocasionalmente, el funcional). Para este nivel jerárquico se emplean términos diversos, que incluyen dominio, clase y arquitectura o plegamiento. Se han desarrollado varias bases de datos que organizan y sistematizan estas clasificaciones [SCOP, Profam, CATH; (6, 7)].

Las clasificaciones aludidas, y la teoría de evolución molecular que se va configurando a partir de su análisis, son referentes de importancia crítica para la utilización biotecnológica de las proteínas.

Análisis del “proteoma”.

También como resultado del desarrollo de los proyectos genómicos, ha sido posible diseñar nuevas y revolucionarias estrategias para el análisis de las proteínas celulares a nivel de su actuación concertada, es decir, de su comportamiento como sistema. Aún cuando ha sido evidente, desde hace muchos años, que la función

biológica resulta de la interacción de diversas moléculas, incluyendo muchas proteínas, no había sido posible abordar directamente el estudio de estos circuitos. En la actualidad, con base en el referente fundamental que representa el genoma completamente secuenciado, se han ido diseñando dispositivos experimentales (por ejemplo, arreglos bidimensionales de muestras en un portaobjetos de microscopio), en los que se analiza simultáneamente la interacción de cada una de miles de proteínas con ligandos particulares (8). Este tipo de análisis, con una visión holística o sistemática, distinguirá sin duda las modalidades más poderosas de investigación biológica en los años por venir.

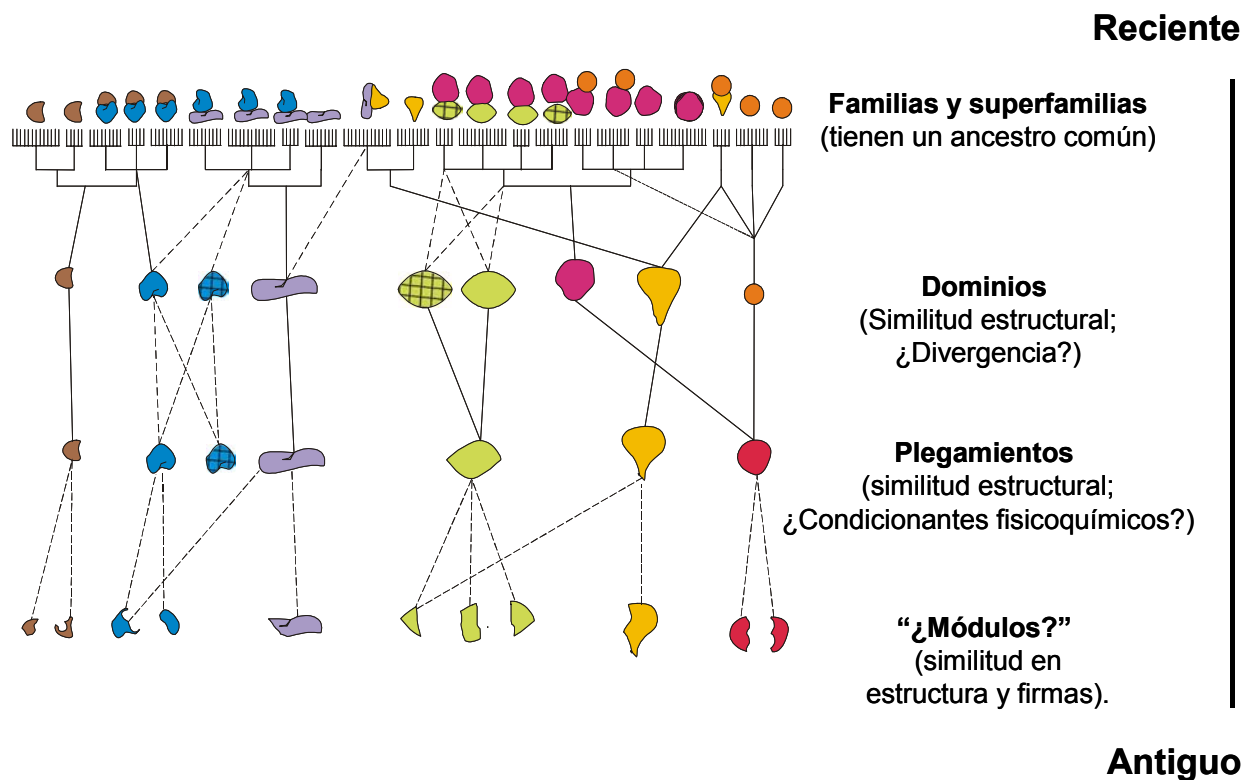


Figura 1. Visión esquemática de la evolución de proteínas. En una concepción similar a la filogenia de especies, se representan las proteínas en un “árbol filogenético”. Las líneas y figuras en la parte superior representan proteínas individuales cuyo parecido a nivel de secuencia permite agruparlas en familias y superfamilias. Los esquemas de diferente forma representan estructuras tridimensionales características, que pueden ser muy similares en proteínas en las que no hay similitud de secuencia estadísticamente significativa. Las líneas conectoras muestran que estos “dominios” pueden observarse en combinación con otros en proteínas de diferentes familias. El análisis estructural y el que se centra en segmentos pequeños con secuencia característica (“firmas”) sugieren la existencia de módulos estructurales, surgidos en las etapas más antiguas de la evolución molecular, que también pueden combinarse en arquitecturas diferentes.

La ingeniería de proteínas y la evolución dirigida: aplicaciones en la investigación básica y la biotecnología.

Como ya se mencionó, se denomina “ingeniería de proteínas” al campo de investigación (y sus herramientas experimentales características), en el que se modifican uno o varios aminoácidos de una proteína natural, como medio para modificar sus propiedades. La mayoría de las veces, estas modificaciones se introducen al nivel del gene que codifica la proteína, por medio de técnicas de ingeniería genética o DNA recombinante.

El problema fundamental.

En la medida en que existe un conocimiento certero y detallado del sistema molecular, será posible emitir hipótesis respecto a las consecuencias estructurales y funcionales que tendrán estas pequeñas modificaciones. Sin embargo, como ya hemos revisado antes, tal conocimiento no está disponible en la actualidad. Es por eso que, en primer lugar, muchos experimentos de “ingeniería de proteínas” en realidad están encaminados a averiguar más acerca de las propias relaciones funcionales. Por otra parte, y en vista de las dificultades que aún conlleva hacer un verdadero diseño racional de proteínas, se ha recurrido a estrategias más “humildes” que, notablemente, no hacen otra cosa que imitar el proceso que, para empezar, dio origen a la diversidad actual de proteínas, es decir el proceso evolutivo. Surge así en los últimos años el concepto de “evolución dirigida” o “evolución forzada” de proteínas. Este enfoque consiste, en esencia, en técnicas de laboratorio que permiten la generación de diversidad molecular, por una parte, y la búsqueda o selección de moléculas con los atributos deseados en muestras de miles o millones de variantes diferentes. En otras palabras, esta metodología imita el proceso evolutivo a nivel de laboratorio, enfocándose en el nivel molecular.

Un proceso de evolución dirigida requiere una serie de pasos que incluyen: la elección de la proteína que se usará como punto de partida, el diseño de un régimen adecuado de mutagénesis (para generar variabilidad molecular) y la implementación de un sistema adecuado de búsqueda o selección.

Es frecuente que los proyectos de ingeniería de proteínas tomen como punto de partida una molécula específica, previamente definida por los requerimientos del proyecto o por razones históricas. Por ejemplo, las proteasas presentes en los detergentes biológicos que se han mejorado por medio o gracias a esta estrategia, suelen ser las mismas que se habían utilizado anteriormente. Las razones para esto son diversas, pero incluyen aspectos tales como factores de mercado y el conocimiento previo que se ha acumulado sobre estos sistemas. Sin embargo, en la actualidad, al elegir una proteína como punto de partida, el investigador encuentra un menú cada vez más amplio. Baste notar que las bases de datos incorporan la secuencia de varios miles de proteínas cada semana, que la anotación sobre las reacciones catalizadas por las enzimas cuyos genes se reportan, y la referencia a información estructural, también crece constantemente. En consecuencia, el repertorio de proteínas al que en principio

se tiene acceso es verdaderamente vasto, pero se requiere analizar las bases de datos con los programas más poderosos y actuales, así como incorporar la máxima cantidad de conocimiento posible, para escoger el mejor punto de partida para un proceso de ingeniería de proteínas. Se trata de incorporar no sólo el análisis de datos de secuencia, estructura y literatura científica asociada, sino de las reacciones químicas que catalizan las enzimas, organizadas alrededor de las respectivas vías metabólicas, en una concepción interactiva entre bioinformática y quimioinformática. Los avances anteriores, aunados a la maduración de los métodos de aislamiento y manipulación de genes, constituyen recursos de biodiversidad subutilizados para el progreso de la biocatálisis. Así, en los próximos años, sería de esperarse un avance sin precedente en la capacidad de reclutar actividades enzimáticas básicas de todo tipo de organismos, incluyendo aquellos adaptados al calor (termófilos), al frío (psicrófilos) o a condiciones extremas de pH y salinidad, así como otros con vías metabólicas diversas y exóticas (quimio litótrofos y otras arqueobacterias y plantas tropicales, entre otros).

Evolución dirigida en la investigación básica. El barril (β/α)₈ como ejemplo.

De cualquier manera, desde hace más de dos décadas, se han utilizado las técnicas de DNA recombinante para estudiar la relación secuencia-estructura-función en proteínas, sobre todo con el enfoque tradicional de la ingeniería de proteínas. Este enfoque ha permitido un importante avance en nuestra comprensión de una gran diversidad de sistemas distintos, tales como los anticuerpos, diversos modelos hormonales, así como muchas enzimas que revisten interés en los más variados campos. Entre los sistemas enzimáticos más estudiados se encuentran los que incluyen dominios con la arquitectura denominada barril (β/α)₈ (o bien barril TIM, por ser la triosa fosfato isomerasa la enzima paradigmática para este plegamiento), que es la arquitectura más abundante entre las enzimas conocidas (Fig. 2). La simplicidad conceptual de este plegamiento representa varias ventajas y su estudio ha generado algunos conceptos muy interesantes, de validez general. La literatura reciente consigna ejemplos dignos de mención en los que se ha abordado el problema con un enfoque de evolución dirigida (9).

Estas investigaciones han reforzado el concepto del origen común de varios linajes de barriles (β/α)₈, por ejemplo, mediante la demostración de la posibilidad de modificar sus especificidades con tan sólo unos cuantos reemplazos de aminoácidos (10), o bien por la observación de que algunas de estas proteínas provienen de la duplicación de un "medio barril" (cada "medio barril" está constituido por cuatro unidades β/α , en el que se detectan vestigios de su homología con las otras cuatro unidades) (11). Vale la pena destacar que la aparición de la actividad que sustenta la hipótesis emitida ha requerido, en estos casos, la introducción de sustituciones al azar, y la selección de las variantes que presentaban la actividad deseada. En nuestro laboratorio hemos trabajado con diversos modelos basados en este tema estructural y empleando evolución dirigida para estudiarlos.

La triosa fosfato isomerasa (TIM) es una enzima esencial en la vía de la glucólisis. Esta enzima está presente en todos los organismos que se han estudiado y el grado de identidad de secuencia es considerablemente alto, aún entre taxones tan distantes como arqueobacterias y organismos superiores (mamíferos o plantas). Todas las TIM cuya estructura ha sido determinada hasta la fecha son dímeros formados por dos subunidades idénticas que tienen un plegamiento de barril (α/β)₈, pero cuyos sitios activos están fuera de la interfase del dímero, por lo que surge la inquietud de saber si esta proteína realmente requiere ser dímero para ser funcional.

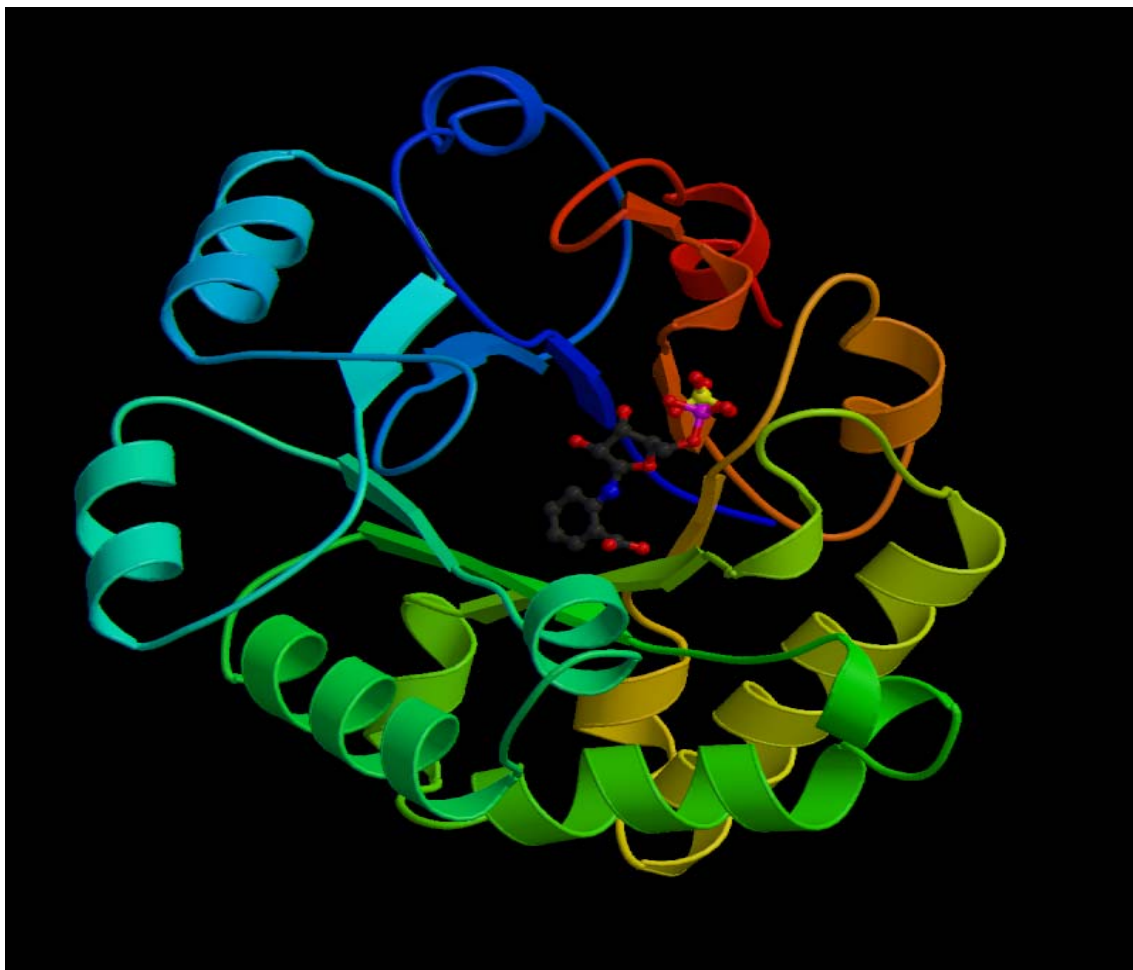


Figura 2. La arquitectura de barril TIM, presente en la isomerasa fosforribosil antranilato (PRA I). Este tipo de arquitectura proteica se caracteriza por tener un barril central de hebras tipo beta, rodeado por alfa hélices. Se presentan ocho elementos beta/alfa (que se destacan con colores similares en cada unidad β/α , para mayor claridad), que se acomodan uno después del otro hasta cerrar la estructura cilíndrica. Es notable que en todas las enzimas descritas con esta arquitectura el sitio activo se encuentra en la misma zona, las asas que conectan la parte carboxilo terminal de las hebras beta con los inicios de las alfa hélices.

Ha habido numerosos intentos para obtener una TIM monomérica y aunque en este sentido otros grupos han sido exitosos, las variantes monoméricas creadas pierden su actividad casi totalmente (12).

Decidimos partir de una de estas variantes monoméricas, la de *Trypanosoma brucei*, (MonoTIM) (12), cuya actividad reportada es de un milésimo de la enzima parental, para regenerar su actividad empleando técnicas de evolución dirigida. Una vez obtenida y validada una cepa de *E. coli* cuyo gene codificante para TIM (*tpi*) había sido eliminado (a nivel cromosomal), se procedió a la obtención de variantes. Se utilizaron dos estrategias para generar variabilidad: mutagénesis al azar de todo el gene de MonoTIM y variabilidad al azar dirigida al asa 2, con la posibilidad de incrementarla en tamaño por hasta dos residuos. Ambas estrategias convergieron en el aislamiento de mutantes que contenían cambios en los residuos Ala 43 y Thr 44. En el caso de Ala 43, las mutantes aisladas por ambas estrategias cambiaron a Pro. Mientras que en el caso de la Thr 44, las mutantes aisladas de la estrategia de mutagénesis al azar de todo el gene la cambiaron a Ala o Ser, en contraste a las seis diferentes clonas seleccionadas de la mutagénesis de la asa 2, en las que invariablemente se encontró Arg en esa posición.

La caracterización cinética de las dos mutantes más activas (una de cada uno de los esquemas de generación de variabilidad) mostró un incremento de 11 veces en la k_{cat} y una disminución de 4 veces en K_m en ambas mutantes, demostrando así la sensibilidad del método de selección. A pesar de que se continuaron las estrategias de evolución dirigida, llevando a cabo recombinación *in vitro* (por la técnica de PCR sexual o gene shuffling); [17] entre las clonas ganadoras, no se logró ningún aumento en la eficiencia catalítica, lo que sugiere que se requiere de cambios más drásticos que los que se pueden lograr por mutagénesis al azar o PCR sexual.

Otro proyecto, concebido y conducido principalmente por los Drs. Enrique Morett y Gloria Saab, del IBT, UNAM se enfoca a la obtención de una actividad catalítica *de novo*. Los análisis de secuencias de familias de proteínas homólogas indican que la gran mayoría de las proteínas han evolucionado de ancestros que tenían actividades enzimáticas distintas. Sin embargo, no se ha demostrado experimentalmente que sea posible modificar la actividad de una enzima más allá de cambios sutiles de especificidad de sustrato. En este proyecto propusieron que una limitante ha sido el no contar con sistemas de selección lo suficientemente sensibles que permitan detectar una actividad enzimática muy baja, lo que se esperaría de una enzima modificada, para que lleve a cabo una reacción distinta a la natural. Propusieron que la vía de la síntesis de tiamina podría ser un sistema adecuado para obtener *de novo* actividades enzimáticas muy pobres, ya que los requerimientos celulares de esta vitamina son excepcionalmente bajos, pero a la vez es indispensable para el crecimiento bacteriano. Nuestro objetivo central ha sido demostrar que se puede lograr la migración catalítica (ver adelante) de una enzima por medio de evolución dirigida en un sistema de selección adecuado.

La tiamina sintetasa es una enzima que cataliza el acoplamiento de 4-amino-2-metil-5-hidroximetilpirimidina pirofosfato (HMP-PP) con el 4-metil-5-hidroxietiltiazol

fosfato para formar la tiamina fosfato. La secuencia y estructura tridimensional de esta proteína son conocidas y, al igual que la triosa fosfato isomerasa, también forma parte de la familia de barriles TIM. Aunque el grado de identidad entre tiamina sintetasa y triosa fosfato isomerasa es muy bajo, tienen en común además de su plegamiento, un sitio de unión a fosfato que se encuentra en la misma asa 7, lo que alienta la posibilidad de migrar un sitio catalítico al otro con una mutagénesis limitada dirigida, en primer lugar hacia las asas beta/alfa y con un paso de selección y una posterior mutagénesis al azar de todo el gene. Posteriormente se pueden incluso recombinar y someter a más ciclos de mutagénesis las claves que muestren algo de actividad.

Durante la primera fase de este proyecto se construyó y se validó una cepa de *E. coli* con delección del gene que codifica para tiamina sintasa (*thiE*-) para llevar a cabo la selección de mutantes con alguna actividad de esta enzima aunque ésta fuera vestigial.

En una segunda fase, se utilizaron los bancos del gene de triosa fosfato isomerasa monomérica (MonoTIM), por mutagénesis al azar, y por la introducción del asa 2 variable de la enzima. De este segundo banco, se han aislado clonas que consistentemente han mostrado complementación de la función de tiamina fosfato sintetasa *in vivo*. Su caracterización a nivel de secuencia muestra que el asa seleccionada es dos residuos más grande que la de la enzima original. La purificación de estas variantes y su caracterización cinética están en proceso, pero los resultados preliminares permiten detectar actividad enzimática *in vitro*.

Evolución dirigida para biocatálisis. La tercera etapa de la biotecnología.

En las secciones anteriores hemos revisado conceptos diversos alrededor de un propósito fundamental: modificar los atributos de proteínas naturales con objetivos específicos. Aunque indudablemente la naturaleza nos ha provisto ya con un gran número de enzimas útiles sin modificación, resulta paradójico que los millones de proteínas naturales seguramente quedarán muy lejos de satisfacer, siquiera medianamente bien, las necesidades humanas. La razón es simple: las proteínas contemporáneas han evolucionado para cumplir funciones específicas dentro de las células y sistemas biológicos a los que pertenecen. La implementación de bioprocesos, las transformaciones químicas requeridas e, incluso, la administración de proteínas naturales en la práctica médica, operan siempre en condiciones que se apartan de las naturales.

Un importante campo de aplicación de la ingeniería de proteínas es, desde luego, el desarrollo de nuevos biocatalizadores, y existe una amplia gama de oportunidades para aplicar técnicas de mejoramiento (13). Esto se puede observar tanto en las aplicaciones en que las enzimas son aditivos en un proceso complejo (por ejemplo, en detergentes biológicos o en aditivos para la industria alimenticia, entre otros), como en aquellas en que la enzima aislada es parte central de un bioproceso (por ejemplo, con biocatalizadores empacados en columnas o en aquellos en que se emplean solventes orgánicos, entre otros) y también en aquellas en que el

biocatalizador se emplea dentro de una célula viva (biotransformaciones cuyo producto se recupera de un caldo de fermentación). Durante los últimos 20 años, la tendencia que se observa en las empresas que comercializan biocatalizadores ha transitado desde el empleo de enzimas en su estado natural, recuperadas también del organismo que originalmente las producía, a una vasta mayoría de enzimas provenientes de genes aislados y clonados en sistemas genéricos para sobreexpresión, hasta la situación actual, en la que la mayoría de los nuevos productos incorporan algún componente de ingeniería de proteínas.

En el trayecto hacia el desarrollo de una industria química más limpia (“química verde”), los procesos biotecnológicos tienen un papel protagónico, en razón de su inherente potencial menos contaminante (14, 15). La posibilidad de tener menos subproductos (especificidad) aunada a la de emplear soluciones acuosas, a temperatura y presión moderadas, permiten concebir procesos benignos con el entorno que, debido a la fuerte presión social, se irán tornando cada vez más costeables. Uno de los elementos que concurre a la viabilidad para este tránsito es la velocidad con la que pueden lograrse procesos útiles, a partir de su concepción hasta su implementación industrial. La ingeniería de proteínas y particularmente la evolución dirigida, están contribuyendo de manera definitiva a disminuir estos tiempos de desarrollo.

En nuestro laboratorio hemos abordado y estamos abordando algunos proyectos cuya razón de ser deriva de la ventaja que representan en procesos específicos, para la producción de compuestos químicos útiles.

Uno de estos proyectos tiene como objetivo la obtención de una versión de penicilino acilasa, independiente de proteólisis a través de permutación circular (es decir, la unión por un enlace peptídico de los extremos amino y carboxilo terminales originales y la creación de nuevos extremos amino y carboxilo situados en algún punto que anteriormente se encontraba en el interior de la secuencia). La enzima penicilino acilasa se emplea ampliamente en la producción de penicilinas semisintéticas, y es producida como un precursor en el citoplasma de bacterias, el cual es posteriormente procesado mediante la escisión de un péptido señal y un endopéptido, produciendo un heterodímero activo en periplasma, constituido por una subunidad A de 209 aminoácidos y una subunidad B de 557 aminoácidos. El análisis de la estructura tridimensional de la enzima (16) muestra que el extremo carboxilo terminal de la subunidad B se encuentra a menos de 5 Å de distancia del extremo amino terminal de la subunidad A (Fig. 3). Con estos antecedentes se realizó un diseño para generar variantes permutadas circularmente de la penicilino acilasa, con el fin de obtener proteínas monoméricas que lleven a cabo catálisis sin tener que sufrir la escisión del endopéptido. Para obtener variantes permutadas activas decidimos producir un banco de proteínas que presentara variabilidad en un conector de 4 aminoácidos de longitud. Dado el número de variantes posibles que se podían producir decidimos montar un método de selección para la actividad de penicilino acilasa en *E. coli*. El sistema de selección consiste en la utilización de una β -lactamasa modificada, que es específica para la hidrólisis de 6-APA (ácido ϵ -amino penicilínico), de tal forma que la actividad de la penicilino acilasa daría como resultado la hidrólisis de penicilina G con la formación

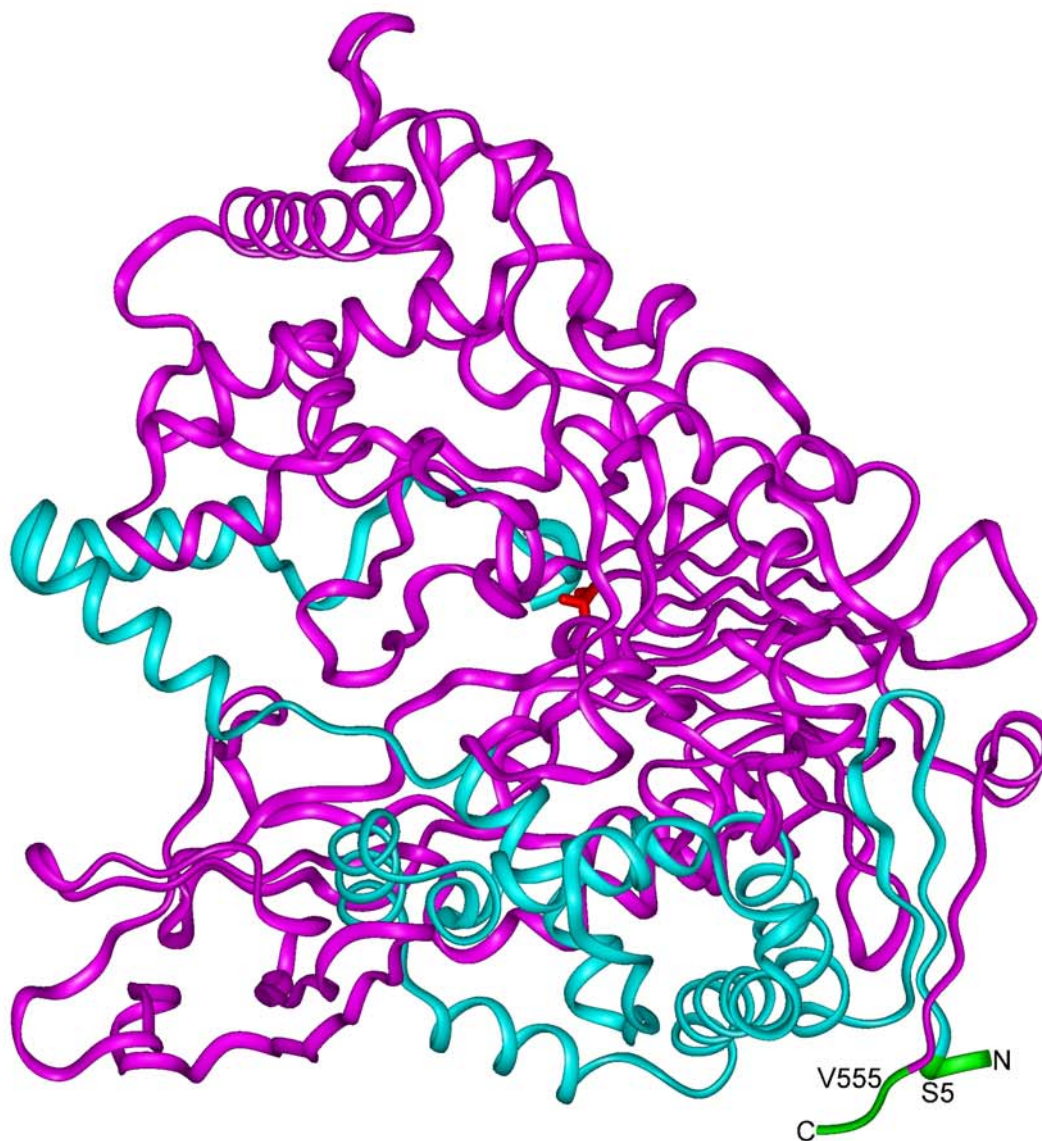


Figura 3. Penicilino acilasa. La estructura tridimensional de la enzima activa muestra que sus extremos carboxilo y amino originales (situados en diferentes subunidades, señaladas en color verde y rojo, respectivamente, después de la reacción proteolítica) se encuentran cercanos. Para unirlos se requirió un diseño que eliminara algunos residuos de cada uno de estos extremos y la inclusión de un pequeño “péptido conector”. Nótese también que el extremo amino terminal generado por la proteólisis, que contiene la serina catalítica (mostrada con todos sus átomos en modelo de varillas), queda situado hacia el interior de la estructura. Este extremo se codifica como el primer aminoácido en la construcción permutada.

de 6-APA y ácido fenilacético y nuestra β -lactamasa 6-APA específica se encargaría de eliminar al 6-APA producido por la penicilino acilasa. El resultado neto sería una resistencia de la bacteria a concentraciones superiores de penicilina G. Mediante técnicas de PCR se generó el banco de la penicilino acilasa permutada con variabilidad en el conector. Se transformaron las bacterias con esta construcción y se seleccionaron variantes con actividad de penicilino acilasa. Se les determinó la actividad a partir de extractos proteicos y se encontraron variantes con actividad, aunque ésta resultó disminuida en 80% respecto a la enzima silvestre lo que, por ensayos posteriores, parece deberse a que las mutantes se expresan en menor cantidad que la silvestre. Datos cinéticos preliminares de dos variantes permutadas con diferente péptido conector muestran valores de la constante catalítica mejorados en las variantes, con respecto a los datos reportados de la enzima silvestre y valores de la constante de Michaelis muy similares a los reportados para la enzima silvestre.

En éste y en otros proyectos de biocatálisis aplicada, pretendemos mantenernos cerca de las entidades que están en condiciones de llevar productos o procesos a los mercados, con una fuerte convicción de que la biocatálisis es un área con un gran potencial de crecimiento. Incluso, por la conjunción de los factores mencionados en la sección anterior podemos afirmar que nos encontramos inmersos en el desarrollo de una “tercera etapa” en las aplicaciones de la biotecnología moderna: aquella que se ubica en los procesos industriales.

En efecto, podemos observar que en una primera etapa se dio el desarrollo de las aplicaciones farmacéuticas, en pleno auge, y que se iniciaron pronto, a principios de los años 80, después de aparecer las técnicas de DNA recombinante. La segunda etapa se identifica con las aplicaciones agrícolas, cuyo despegue se demoró por la dificultad inherente al manejo de los sistemas vegetales, y que adquirió gran vigencia durante la década de los 90s. Este tipo de aplicaciones, por cierto, se encuentran asediadas por cuestionamientos, en su mayoría poco fundamentados, que han encontrado eco en la opinión pública. Paradójicamente, tanto las aplicaciones agrícolas de la segunda etapa, como las industriales que constituyen la tercera, entrañan un enorme potencial para contribuir a garantizar un desarrollo sustentable, que es el asunto que preocupa a las organizaciones ambientalistas, hoy por hoy las enemigas más visibles de la biotecnología moderna.

En conclusión, podemos decir que la investigación contemporánea sobre la relación entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas está viviendo una época de gran auge, en razón de la convergencia de novedosos enfoques metodológicos, la madurez en la formalización de la descripción teórica y rigurosa de estos sistemas, así como la aparición de los proyectos genómicos. Los conocimientos y métodos que vayan resultando de esta activa área contribuirán a esclarecer uno de los problemas básicos de la biología, al tiempo que permitirán la utilización de los sistemas proteicos para desarrollar procesos biotecnológicos con impacto creciente en una industria química sustentable, cada vez más respetuosa del entorno.

Agradecimientos:

Los conceptos y proyectos descritos en este artículo se han enriquecido constantemente con las discusiones sostenidas en el consorcio de grupos de investigación que coordinamos Enrique Morett, Lorenzo Segovia, Eduardo Horjales y Alejandro Garcarrubio. Las investigaciones han sido posibles, en parte, gracias al financiamiento de CONACYT (proyecto #G0030N9608 “Evolución dirigida de proteínas: Desarrollo de conceptos y metodologías para la generación de reconocimiento y catálisis de novo”).

Referencias.

1. Dobson ChM y Karplus M (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol* 9: 92-101.
2. Baldwin RL y Rose GD (1999) Is protein folding hierarchic? *TIBS* 24: 26-33.
3. Ptitsyn O. (1999) Folding and binding the biological consequences of physical principles. *Curr Opin Struct Biol* 9: 89-91.
4. Bork P, Ouzounis CH y Sander CH (1994) From genome sequences to protein function. *Curr Opin Struct Biol* 4: 393-403.
5. Chance MR, Bresnick AR, Burley SK y col. (2002) Structural genomics: a pipeline for providing structures for the biologist. *Protein Science* 11: 723-728.
6. Orengo CA, Michie AD, Jones S, Jones DT, Swindells MB y Thornton JM (1997) CATH - a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure* 5: 1093-1108.
7. Murzin AG, Brenner SE, Hubbardt T y Chothia C (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* 247: 536-540.
8. Wood DW. (2001) Conquering the proteome: complexity, cooperation and commerce. *Trends in Biotechnology* 19: 375-376.
9. Wymer N, Buchanan LV, Henderson D y col. (2001) Directed evolution of a new catalytic site in 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Escherichia coli*. *Structure* 9: 1-9.
10. Jürgens C, Strom A, Wegener D, Hettwer S, Wilmanns M y Sterner R (2000) Directed evolution of a $(\beta\alpha)_8$ barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9925-9930.
11. Gerlt JA y Babbitt PC (2001) Barrel in pieces? *Nature Structural Biology* 8: 5-7.
12. Borchert TV, Abagyan R, Jaenicke R y Wierenga RK (1994) Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1515-1518.
13. Walsh C, Koeller KM, Wong C-H y col. (2001) Enabling the chemistry of life; Enzymes for chemical synthesis; Improving enzymes by using them in organic solvents; Modular enzymes; Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design; Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature Insight Biocatalysis* 409: 226-258.
14. Petersen G y Scouten WH (1999) Why have a bioprocessing/Biotechnology work group and a biocatalysis strategic plan?; The visioning process and drivers; The

present state of biocatalysts; The workshop; How do we get to 2020? How far are we? What will it take to get there?; Implementing the R&D in the roadmap. *New Biocatalysts* 1: 1-38.

15. Rozzell JD. (1999) Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7: 2253-2261.
16. Duggleby HJ, Tolley SP, Hill ChP, Dodson EJ, Dodson GG y Moody PCE (1995) Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* 373: 264-268.
17. Stemmer WPC (1994) Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-391.



Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez-Contreras E, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2002).

(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS

Wilhelm Hansberg Torres

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México
Circuito exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Apartado Postal 70-242;
México, D.F. 04510 México, Tel: 5622 5655,
whansber@ifisiol.unam.mx

El dióxígeno y las especies de oxígeno reactivas

Sabemos que el 21% de nuestra atmósfera es **dióxígeno** (O_2) y que prácticamente todo es de origen biológico. El O_2 atmosférico es producto de la oxidación del agua que lleva a cabo el fotosistema II de las plantas, algas y cianobacterias con la luz solar. También sabemos que la mayoría de los organismos, entre ellos nosotros, utilizamos el O_2 para respirar y muchos no podemos vivir sin él. Reducimos el O_2 en agua y la energía de esta reacción, que originalmente provino del sol, la utilizamos para formar ATP y para transportar iones y metabolitos a través de las membranas celulares. Aproximadamente el 80% del ATP que utilizamos se forma en las mitocondrias en donde se consume entre el 85 y el 90% del O_2 . Es por ello que no podemos vivir sin respirar. La fotosíntesis oxigénica y la respiración forman un circuito continuo de oxidación del agua y reducción del O_2 (Fig. 1). Este ciclo de

óxido/reducción no ha cambiado desde hace millones de años y tampoco la biomasa total de la tierra. Lo que ha cambiado en ese tiempo son los organismos que llevan a cabo el ciclo. Lo cual nos lleva a concluir que el aumento explosivo de la población humana y de los animales domésticos ha sido a expensas de otras especies que respiran (Fig. 1).

El O_2 de la atmósfera reacciona con algunos metales y los oxida, por ejemplo, el hierro expuesto a la intemperie. Observamos que algunos compuestos orgánicos también se oxidan, por ejemplo, una manzana abierta cambia su color en contacto con el aire. El O_2 reacciona y se combina con casi cualquier otro elemento pero, en la mayoría de los casos, sólo lo hace a temperaturas elevadas. Esto es, el O_2 en su estado basal y a la temperatura ambiente reacciona, pero poco.

Por otro lado, la solubilidad del O_2 en el agua es baja y es más baja mientras más sales estén disueltas y más alta sea la temperatura. La concentración del O_2 en agua destilada, en equilibrio con la atmósfera a nivel del mar a $25^\circ C$, es de $258 \mu M$. En la sangre arterial la concentración del O_2 es $\approx 130 \mu M$ y en la venosa de $\approx 50 \mu M$; en las células es menor a $13 \mu M$ y menos de $1 \mu M$ en la mitocondria. Esto es, hay una diferencia de dos órdenes de magnitud en la concentración del O_2 entre el sitio de entrada y el de su consumo. Sin embargo, también hay que considerar que la solubilidad del O_2 es mayor (≈ 8 veces) en solventes orgánicos que en el agua; es más soluble en las membranas celulares, donde se lleva a cabo la respiración, que en el citosol.

Porque lo requerimos para respirar, hemos considerado al O_2 como sinónimo de vida, cuando en realidad es por el O_2 que nos enfermamos y nos morimos. La gran concentración del O_2 en la atmósfera y su baja reactividad en condiciones ambientales ha generado la impresión en la población de que el O_2 es inocuo. Esta concepción se ha extendido inclusive entre los médicos. Así, es común que al recién nacido, sobre todo si es prematuro, se le aplique O_2 . Cuando se administra en demasía perjudica al niño, causándole, por ejemplo, una fibropatía retrolental o problemas respiratorios. Hay muchos datos que indican que el O_2 es tóxico y lo es a cualquier concentración. Así, por ejemplo, muchos microorganismos se alejan del O_2 y se estratifican dentro de un gradiente de O_2 según sus requerimientos y capacidades antioxidantes. Las plantas crecen mejor en ausencia del O_2 . Las radiaciones ionizantes son más tóxicas en presencia de altas concentraciones de O_2 , lo cual se utiliza en el tratamiento de algunos tumores cancerosos.

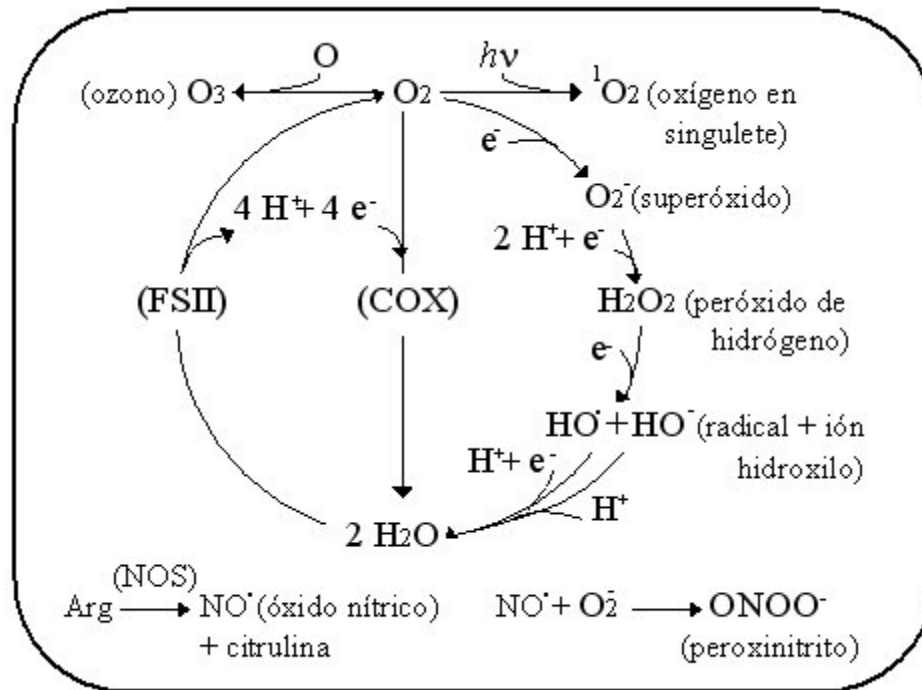


Figura 1. Las principales especies de oxígeno reactivas. Las especies de oxígeno reactivas se generan por la ruptura o la excitación del dioxígeno (O , O_3 , 1O_2) o por la reducción parcial del mismo (O_2^- , H_2O_2 , HO^\cdot). El fotosistema II (FSII) lleva a cabo la oxidación completa del agua en dioxígeno (fotosíntesis) mientras que la oxidasa del citocromo c (COX) efectúa la reducción completa del dioxígeno en agua (respiración). El óxido nítrico (NO^\cdot) se produce por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), en cambio, el peroxinitrito se produce de manera espontánea. $h\nu$ = energía de radiación. Esquema tomado de la fig. 1 de la ref. 68.

La toxicidad del O_2 se explica debido a la formación de las **especies de oxígeno reactivas**. Estas especies son derivados del O_2 que son más reactivos que éste en su estado basal de triplete. Las principales son: las especies que son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 , o sea, el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno en singlete, y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Fig. 1).

La luz ultravioleta y las descargas eléctricas rompen los dos enlaces covalentes en la molécula del O_2 produciendo **oxígeno atómico** (O) que se combina inmediatamente con el O_2 para producir el **ozono** (O_3). La absorción de la luz ultravioleta (UVC) por el O_2 y el O_3 de la estratósfera evita que ésta llegue a la superficie terrestre, lo cual posibilitó hace unos dos mil millones de años que la vida se extendiera en el planeta. Como la luz UVC es absorbida por los ácidos nucleicos y los modifica, los organismos no podían sobrevivir expuestos a la luz solar, lo que les impedía la colonización de la tierra. Actualmente nuestro desarrollo tecnológico e industrial está afectando peligrosamente esta protección natural de los UVC: los

fluoroclorocarbonos gaseosos usados para las compresoras y los aerosoles generan radicales de halógeno en la estratósfera que destruyen el O_3 en una reacción en cadena que tardará varios decenios en parar. La máxima concentración de O_3 en nuestra atmósfera está a unos 25 km de la superficie terrestre. Sin embargo, el O_3 también se genera a nivel de la superficie terrestre por efecto de la luz sobre el **dioxígeno de nitrógeno** (NO_2^{\cdot}) que genera la combustión de la materia orgánica, principalmente en los automotores. El NO_2^{\cdot} , en presencia de algunos hidrocarburos contaminantes, se descompone en NO^{\cdot} y O y este último reacciona con el O_2 para formar el O_3 .

El O_3 es un gas irritante, de olor penetrante. Es mucho más oxidante que el O_2 pues reacciona con las proteínas, los lípidos, el NAD(P)H, el ascorbato, el ácido úrico y también genera otras especies reactivas. En soluciones ácidas es uno de los compuestos más reactivos. A una concentración de 0.5 ppm causa inflamación y muerte celular en los bronquios y los alveolos pulmonares, sobre todo en las personas mayores y los niños.

El O_2 es un dirradical, esto es, tiene dos electrones libres o desapareados. Estos electrones tienen el mismo giro, por lo que sólo pueden interaccionar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto. Ésta es la razón por la cual el O_2 no es muy reactivo. El **oxígeno en singulete** (1O_2) se forma cuando uno de los dos electrones libres capta energía y cambia de giro. Cuando eso sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre. Por eso hay dos especies de oxígeno en singulete, el $^1\Sigma g^+$, que tiene los dos electrones desapareados pero con giros opuestos, y el $^1\Delta g$, en el que estos electrones se han apareado (Fig. 2). El primero decae muy rápido y para la biología sólo tiene importancia el segundo. El $^1\Delta g$ es también inestable, decae al estado basal, emitiendo un fotón a 1,268 nm, o reacciona porque, ahora sí, puede aceptar dos electrones, libres o apareados.

Las células tienen sustancias con color, tales como las flavinas, las porfirinas y sus derivados, las quinonas, las pterinas y, en los organismos que llevan a cabo la fotosíntesis, las clorofilas. Estos compuestos son excitados generalmente con la luz azul (430–490 nm) y el componente A de la luz ultravioleta (UV_A 320–400 nm). Los compuestos excitados pueden transferir su energía al O_2 y formar el 1O_2 (1). También, en presencia de una sustancia reductora (que cede fácilmente electrones) el colorante se puede reducir y con el O_2 formar el **ion superóxido** ($O_2^{\cdot-}$). El 1O_2 también se forma en la dismutación espontánea del $O_2^{\cdot-}$, de la descomposición del **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2), o de los ácidos hipohalogenosos. También los lipoperóxidos, generados por algunos radicales, pueden liberar 1O_2 .

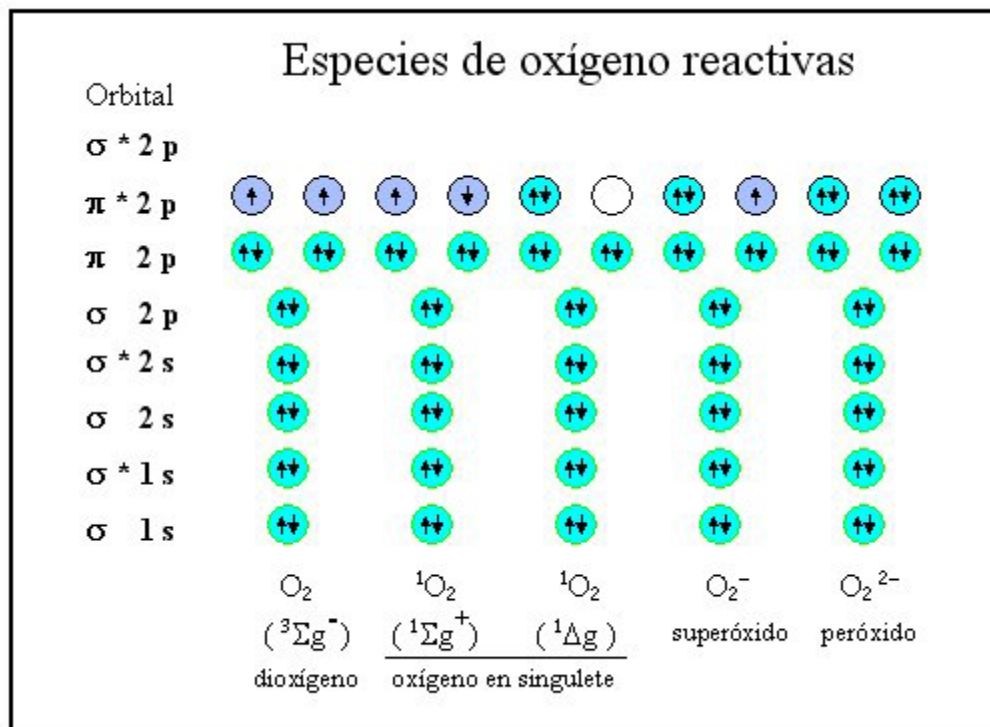


Figura 2. Configuración electrónica de algunas moléculas de oxígeno diatómico. A diferencia del superóxido y del ion peróxido, el oxígeno en singlete puede aceptar pares de electrones, lo cual lo hace muy reactivo. Figura modificada de la figura 1.12. de Halliwell B y Gutteridge JMC (1999). Free radicals in biology and medicine. 3ª edición, Oxford University Press, Oxford.

El 1O_2 es muy reactivo y es capaz de reaccionar con la mayoría de compuestos celulares. El producido fuera de las células reacciona fundamentalmente con las membranas plasmáticas; el producido dentro de las células reacciona con el ADN, las proteínas y los lípidos y otros compuestos celulares, cerca de donde se produce (1).

El O_2^- se forma cuando el O_2 capta un electrón. Esto ocurre en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria sale de ésta y es captada por el O_2 . Esto ocurre principalmente a nivel de la semiubiquinona o del ubiquinol y también del complejo I (NADH coenzima Q reductasa). La ubiquinona puede aceptar con facilidad uno o dos electrones y cederlos al O_2 . Alrededor del 1% del O_2 consumido en la respiración genera O_2^- lo cual significa que una persona de 70 Kg en reposo genera unos dos litros de O_2^- al día. Con el ejercicio el consumo de O_2 y por lo tanto la generación de O_2^- aumenta hasta diez veces. Además de la mitocondrial, las cadenas de transporte de electrones del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear también pueden generar O_2^- . Los **citocromos P₄₅₀**, una superfamilia de proteínas capaces de hidroxilar una gran variedad de xenobióticos, pueden generar O_2^- . Algunas oxidasas como la oxidasa del NADPH, la oxidasa de xantina y algunas peroxidases inespecíficas producen O_2^- . El 3% de la hemoglobina de un individuo se oxida al día generando metahemoglobina y O_2^- . El O_2^-

también se puede formar a partir de la autooxidación de compuestos como el gliceraldehído o de las flavinas y las tetrahidropterinas reducidas. Se ha calculado que la concentración del O_2^- en la célula está en el intervalo de pico a nanomolar.

Contrario a lo que generalmente se piensa, el O_2^- es poco reactivo. Sólo reacciona a una tasa importante con las quinonas, los fenoles, con el hierro libre o unido a algunas proteínas, por ejemplo los centros [Fe-S] y también con otros radicales (el propio O_2^- , el óxido nítrico y los radicales fenoxi). La dismutación espontánea del O_2^- ocurre sólo cuando uno de los O_2^- se protona para formar el **radical hidroperoxilo** (HO_2^\cdot), por lo que la velocidad de reacción es mayor mientras más ácido sea el medio. El O_2^- inhibe algunas enzimas como la deshidrogenasa de 6-fosfogluconato, la aconitasa y la fumarasa lo que afecta la reducción del NAD^+ y el metabolismo energético. También inhibe la tercera enzima de la vía de síntesis de los aminoácidos ramificados, la deshidratasa del dihidroxiácido, la reductasa de ribonucleótido que genera los difosfato de desoxiribonucleósidos para la síntesis del ADN, y una fosfatasa de proteína, la calcineurina, importante en la transducción de señales. El O_2^- reduce el Fe(III) en Fe^{2+} , reacciona con el ascorbato ($10^5 M^{-1} s^{-1}$) pero no reacciona con el NAD(P)H, con el ADN, con los lípidos, ni con los aminoácidos de las proteínas.

La mayor parte del H_2O_2 o agua oxigenada proviene de la dismutación del O_2^- , aunque también algunas oxidasas lo producen como la oxidasa de xantina, las oxidasas de aminoácidos, las oxidasas de hexosas y las oxidasas de fenoles, entre otras. La concentración del H_2O_2 en las células varía mucho dependiendo del organismo o del tejido y va desde pico o nanomolar hasta cerca de 100 μM , por ejemplo cuando se generan cataratas en el cristalino ocular.

El H_2O_2 es poco reactivo y se puede difundir a través de los compartimentos celulares aunque tiende a formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Reacciona poco con el ascorbato y no reacciona con compuestos como el NAD(P)H, el ADN, los lípidos, o la mayoría de las proteínas, inclusive a concentraciones milimolares. Algunas enzimas, como la deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato o la fosfatasa de fructosa-1,6-difosfato del cloroplasto, sí se inactivan con el H_2O_2 . El H_2O_2 reacciona lentamente con algunos cetoácidos, como el piruvato o el α -cetoglutarato.

Tanto el O_2^- como el H_2O_2 son compuestos que reaccionan poco. Sin embargo, ambos son tóxicos principalmente porque generan 1O_2 y HO^\cdot . El H_2O_2 es tóxico para la mayoría de las células a una concentración de 10 a 100 μM . Cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ , entonces se fragmenta y forma el **radical hidroxilo** (HO^\cdot) y el **ión hidroxilo** HO^- (reacción de Fenton). Este último es inocuo, se protona para formar agua; en cambio, el HO^\cdot es uno de los compuestos más reactivos que existen. El HO^\cdot casi no se puede difundir porque reacciona rápidamente ($10^9 M^{-1} s^{-1}$) y lo hace prácticamente con cualquier compuesto en el sitio en donde se produce. La urea es uno de los pocos compuestos con los que el HO^\cdot reacciona menos rápido ($10^5 M^{-1} s^{-1}$). La estimulación

de la reacción de Fenton con el O_2^- es la reacción de Haber-Weiss ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow HO\cdot + HO^- + O_2$) ya que sólo ocurre en presencia de trazas de un metal de transición.

La mayoría de los **metales de transición** contiene electrones desapareados. El Fe^{2+} tiene cuatro y el Fe(III) tiene cinco electrones desapareados; el Cu y el Cu^{2+} tienen un electrón libre; el Cu^+ no tiene electrones desapareados pero acepta fácilmente uno para formar el Cu^{2+} . Por eso, muchos iones de los metales de transición son radicales y pueden participar donando o aceptando electrones. Así, el Fe^{2+} en solución cede un electrón al O_2 formando Fe(III) y O_2^- ; por el contrario, el Cu^{2+} y el Mn^{2+} aceptan un electrón del O_2^- con lo cual catalizan la dismutación del mismo. En cambio, el Zn^{2+} y el Al(III) no participan en reacciones de radicales. Tal vez por eso se utiliza el Zn^{2+} para estabilizar sobre todo las cisteínas de las proteínas como los factores de transcripción con dedos de Zn. En la célula el hierro y el cobre pueden catalizar la autooxidación de compuestos como el NAD(P)H, el ascorbato, los tioles, las pteridinas reducidas y otros compuestos. La toxicidad del O_2^- y del H_2O_2 depende en gran medida de la disponibilidad y la distribución de estos metales de transición.

Además de las especies de oxígeno reactivas mencionadas, en la última década se ha descubierto que hay otras especies de oxígeno combinadas con el nitrógeno que son importantes en la biología. Tal es el caso del **monóxido de nitrógeno** u **óxido nítrico** ($NO\cdot$). El $NO\cdot$ es un gas incoloro relativamente soluble que se forma a través de la óxido nítrico sintasa a partir del grupo guanidino de la arginina (Fig. 1). La concentración fisiológica del $NO\cdot$ es de orden nanomolar, aunque puede llegar a ser micromolar en el sitio en el que se produce.

El $NO\cdot$ es un radical porque tiene un electrón desapareado. Sin embargo, igual que el O_2^- , al cual se parece mucho, el $NO\cdot$ no es muy reactivo y se puede difundir. Reacciona lentamente con los tioles formando tionitritos (nitrosotioles) o con los sulfhidrilos de algunas enzimas (deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato). En cambio, reacciona rápidamente con otros radicales, como con el O_2 , generando $NO_2\cdot$ y con el O_2^- generando **peroxinitrito** ($ONOO^-$). Ambos compuestos son más oxidantes que el $NO\cdot$. El $NO\cdot$ también reacciona con radicales de aminoácidos, como el radical tirosina, que se encuentra, por ejemplo, en el sitio activo de la reductasa de ribonucleótido. Aún no está claro si éstas y otras especies de nitrógeno reactivo tienen algún papel *in vivo*, pero se piensa que, para que genere daño, el $NO\cdot$ se debe transformar primero en un compuesto más reactivo, como el $NO_2\cdot$, el $ONOO^-$ o el **trióxido de dinitrógeno** (N_2O_3).

El $NO\cdot$ se une a varios metales de transición como al hierro de las hemoproteínas o los centros [Fe-S] de las enzimas mitocondriales. La inhibición de la oxidasa del citocromo c por el $NO\cdot$ puede tener un efecto metabólico importante. La mayor parte del $NO\cdot$ que se produce en los tejidos se une a la hemoglobina o a la mioglobina produciendo metahemoglobina o metamioglobina y nitrato (NO_3). Este último se elimina por la orina.

El daño que causan las especies de oxígeno reactivas y los mecanismos de reparación

Ante una determinada tensión oxidativa, los organismos se suelen adaptar rápidamente. En general, un estímulo oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir luego condiciones más oxidantes. Sin embargo, las especies de oxígeno reactivas que se producen en cualquier estado fisiológico, producen continuamente daño al ADN, a las proteínas y a los lípidos. Así, se pueden detectar en individuos sanos bases nitrogenadas alteradas en el ADN, aminoácidos modificados en las proteínas y peroxidación de lípidos.

En el **ADN** ocurre, a una tasa baja pero continua, la pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timidina y la ruptura de una o las dos hebras del ADN. Estas alteraciones se incrementan considerablemente con la tensión oxidativa (2). En muchas células se generan modificaciones en las bases del ADN cuando se les añade H_2O_2 . Esto se debe en gran parte a los metales de transición, fundamentalmente al Fe^{2+} , que se encuentran unidos al ADN y que en presencia del H_2O_2 generan $HO\cdot$ que modifica las bases del mismo. El $HO\cdot$ puede atacar tanto las purinas como las pirimidinas, así como la desoxiribosa y además generar rupturas en el ADN. El 1O_2 es más selectivo y generalmente produce sólo aductos de guanina, sobre todo **8-hidroxi guanina** (Fig. 3). La 8-hidroxi guanina también se puede generar a través de otras reacciones. En condiciones de tensión oxidativa las proteínas que normalmente están unidas al ADN pueden generar uniones covalentes con él, por ejemplo, una unión entre una tirosina y una timina. Asimismo, los lipoperóxidos pueden reaccionar con el ADN y modificarlo. El ADN de las mitocondrias y del cloroplasto también se modifica. De hecho, el ADN mitocondrial de los animales generalmente presenta un mayor número de modificaciones que el ADN nuclear.

Los cambios en las bases nitrogenadas pueden generar mutaciones cuando se duplica el ADN. Por ejemplo, la 8-hidroxi guanina puede hacer puentes de hidrógeno con una adenina en vez de con una citosina y la 8-hidroxi adenina con una guanina en vez de con una timina. Cuando hay rupturas en el ADN se activan las polimerasas de poli(ADP-ribosa) (PARP) que unen residuos de ADP-ribosa formando cadenas ramificadas unidas a residuos de glutamato de la propia PARP y de algunas proteínas que están asociadas con el ADN (Fig. 3). El sustrato de la **poliADPribosilación** es el NAD^+ celular que se consume rápidamente. La glicohidrolasa de la poli(ADP-ribosa) despolimeriza simultáneamente el polímero por lo que la reacción sólo dura unos cuantos minutos. Muchas proteínas nucleares se unen a los polímeros de ADP-ribosa de dichas proteínas lo cual modifica su actividad (3). Se piensa que esta reacción facilita la acción de los mecanismos de reparación de las rupturas en el ADN. Hay mecanismos de reparación específicos que sustituyen las bases mal apareadas, oxidadas, desaminadas o que añaden la base faltante y otros que degradan un tramo de nucleótidos en una hebra alrededor de la región alterada y luego una polimerasa de ADN y una ligasa de ADN reparan el tramo (2). En el hombre se conocen varias enfermedades, como el xeroderma pigmentoso, la ataxia telangectasia y el síndrome de Bloom, en las cuales están afectados algunos de estos mecanismos de reparación del ADN.

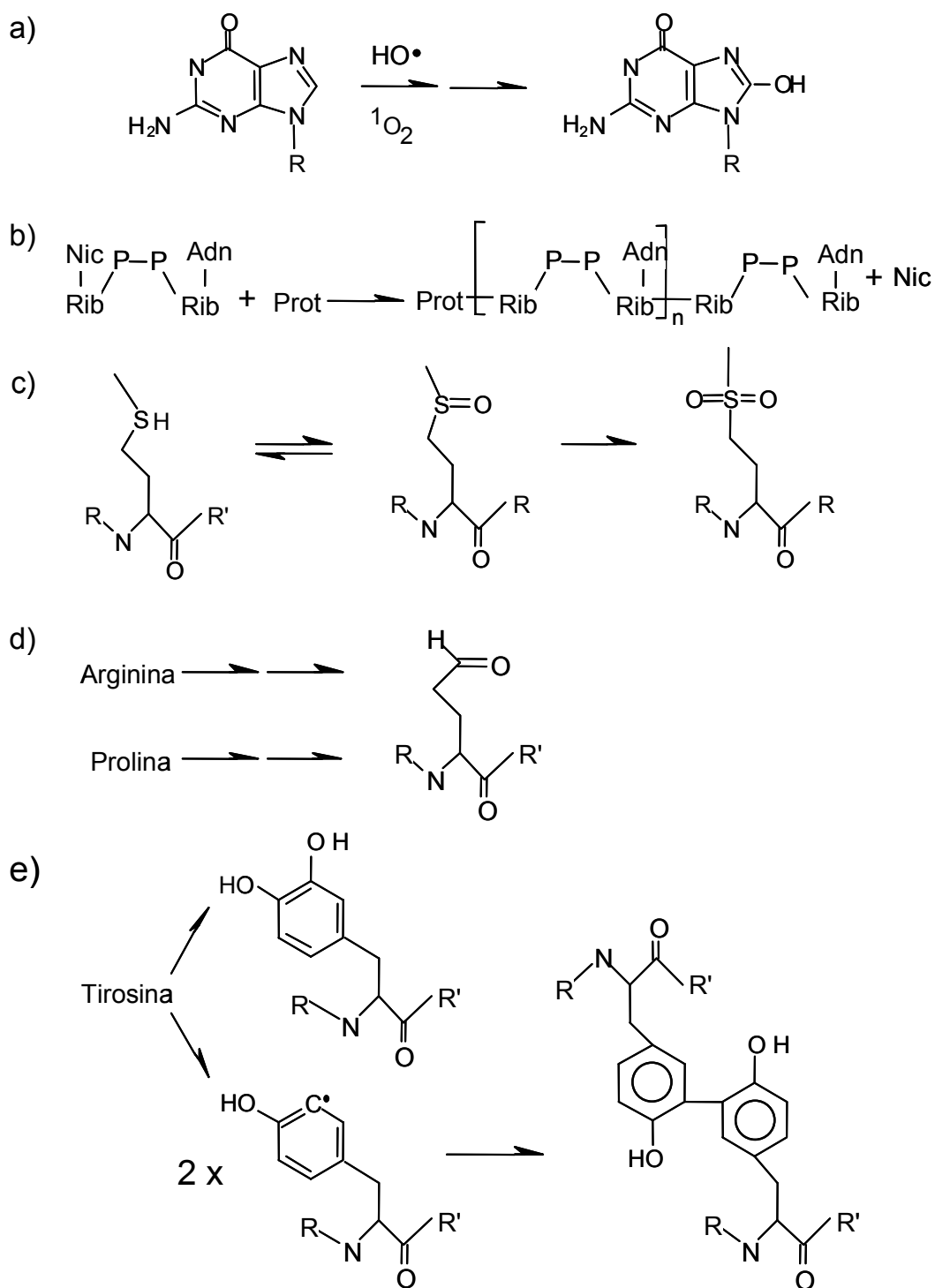


Figura 3. Productos de oxidación en el ADN y las proteínas. a) La 8-hidroxi guanina es el principal producto de oxidación de las bases nitrogenadas especialmente con el $^1\text{O}_2$. b) La ADPribosa se polimeriza enzimáticamente en las proteínas que se unen al ADN en los sitios de ruptura del mismo; n puede ser hasta 200 con varias ramificaciones. c) La formación reversible del sulfóxido de metionina e irreversible de la sulfona de metionina. d) La prolina y la arginina generan el semialdehído de glutámico. El carbonilo que se forma se detecta por la formación de la base de Schiff. e) La tirosina (o la fenilalanina) se hidroxila para generar dihidroxifenilalanina (DOPA) y dos radicales tirosilo pueden formar ditirosina.

Las **proteínas** son las que llevan a cabo la mayoría de las funciones celulares. Muchas proteínas son capaces de absorber una gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función. Sin embargo, es indudable que las consecuencias de las alteraciones en algunas funciones, por ejemplo, la recepción y transmisión de señales, el transporte de iones, la duplicación y la reparación del ADN, las respuestas a condiciones de tensión y el metabolismo energético, la transcripción y traducción pueden ser críticas para la célula. Algunas enzimas se inactivan o se activan con el O_2^- y el H_2O_2 cuando interaccionan con metioninas o cisteínas susceptibles. Estas reacciones son reversibles y por ello tienen importancia en la regulación de algunas actividades enzimáticas. El sulfóxido de metionina (Fig. 3) se reduce con la reductasa del sulfóxido de metionina peptídico y los puentes disulfuro se reducen con glutatión, con tioredoxina u otras enzimas.

La mayoría de daños en las proteínas son ocasionados por el $HO\cdot$. El $HO\cdot$ reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se forma, que generalmente son sitios en donde se encuentra un metal de transición. Así la sintetasa de glutamina de *Neurospora crassa* se inactiva cuando es oxidada por un $HO\cdot$ que se forma por la reacción del H_2O_2 con un hierro unido posiblemente cerca del sitio activo (4). La deshidrogenasa del glutamato dependiente del NADPH se inactiva cuando es oxidada por un $HO\cdot$ que se forma por la reacción del H_2O_2 con un hierro unido a su sitio alostérico (5). El 1O_2 es más selectivo y reacciona particularmente con los aminoácidos triptofano, tirosina, histidina, lisina, metionina y cisteína (1, 6). También reaccionan con el grupo hemo de las catalasas de *N. crassa* (7) y la de células humanas (U937) (8) sin afectar mucho su actividad. El grado de oxidación de las proteínas de una célula se puede medir detectando carbonilos en la proteína total purificada. Los carbonilos se forman por la oxidación de la prolina y la arginina en semialdehído de glutamato (Fig. 3) y por rupturas de la cadena peptídica.

Los daños producidos por el $HO\cdot$ y el 1O_2 son irreversibles y en términos generales marcan las proteínas para su degradación. En los eucariotos, la mayoría de proteínas oxidadas se degradan en el citosol y sólo algunas en los lisosomas. El reconocimiento de los sitios oxidados o halogenados o la exposición de regiones hidrofóbicas determinan la ubiquitinación de las proteínas y su degradación en el proteasoma. La **ubiquitina** es una proteína pequeña que se une covalentemente a las lisinas de las proteínas alteradas a través de un sistema de tres enzimas. La primera enzima utiliza ATP para activar el carboxilo terminal de la ubiquitina y unirlo a una de sus cisteínas, la segunda acarrea la ubiquitina y la tercera transfiere la ubiquitina al ϵ -amino de una lisina de la proteína alterada. Otro grupo de proteínas reconoce las proteínas ubiquitinadas y las lleva al proteasoma donde son degradadas. Las bacterias no tienen sistema de ubiquitinación pero tienen varias proteasas que utilizan ATP.

Las **membranas** celulares contienen fosfolípidos que tienen ácidos grasos con varias ligaduras dobles. Estos ácidos grasos poliinsaturados son más lábiles a la oxidación que los saturados y los monoinsaturados porque los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno (hidrógeno alílico). Las especies de oxígeno reactivas que pueden robar estos hidrógenos son el $HO\cdot$ y el $HO_2\cdot$.

Una vez generado el radical carbono en un ácido graso, éste reacciona con el O_2 para formar un radical peroxilo. El radical peroxilo puede robar un hidrógeno alílico a otro metileno con lo cual se propaga la reacción (Fig. 4). Así una iniciación puede generar muchos lipoperóxidos. El 1O_2 genera endoperóxidos con los ácidos grasos poliinsaturados que se descomponen en presencia de hierro formando radicales alcoxilo que contribuyen a la propagación de la lipoperoxidación. Los lipoperóxidos se pueden reducir mediante glutatión peroxidasa de fosfolípidos o son eliminados a través de las fosfolipasas como la fosfolipasa A_2 , que aumenta durante la tensión oxidativa.

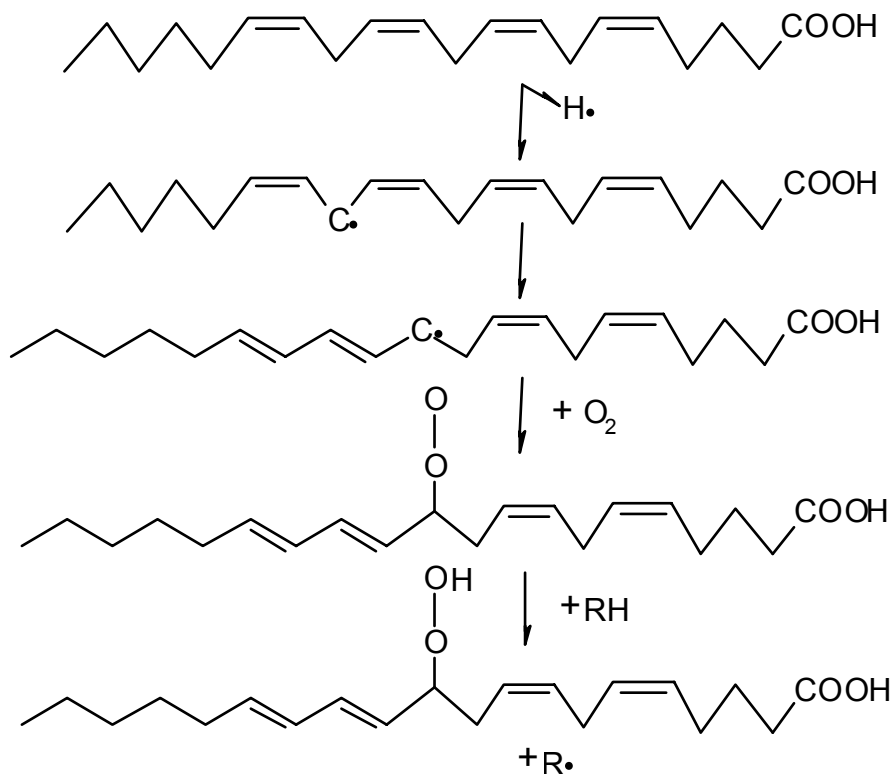


Figura 4. Oxidación de lípidos. Se ejemplifica una posible modificación del ácido araquidónico: a) la abstracción de un hidrógeno alílico genera un radical en un carbono, b) éste puede migrar, con lo cual hay un reacomodo de las dobles ligaduras y c) en presencia del dioxígeno se genera un radical peroxilo que d) se puede apropiarse de un hidrógeno de otro lípido, con lo que se propaga la reacción.

Compuestos antioxidantes

El daño que causan las especies de oxígeno reactivas es contrarrestado en gran medida por los mecanismos antioxidantes celulares y los mecanismos de recambio y reparación. Los mecanismos antioxidantes son muy diversos y en cada organismo, célula o tejido predominan algunos sobre otros. Hay compuestos antioxidantes con varias funciones, enzimas antioxidantes que mantienen en forma reducida dichos

compuestos antioxidantes y enzimas que eliminan el O_2^- y el H_2O_2 evitando así la formación del 1O_2 y del HO^\cdot . A parte de los mecanismos antioxidantes específicos, muchos otros compuestos y enzimas contribuyen de diversas maneras a mantener el estado redox celular.

El hierro es indispensable para muchas enzimas que llevan a cabo reacciones de oxido/reducción o el transporte del O_2 , pero a la vez contribuye a la formación del HO^\cdot . Por ello el **metabolismo del hierro** es crítico y está muy regulado. En bacterias y en hongos el hierro se incorpora directamente como Fe^{2+} o como Fe(III) unido a **sideróforos** y se almacena en la **ferritina**. En *Escherichia coli* y otras bacterias la proteína *fur* unida al Fe^{2+} reprime la síntesis de las proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro. La ausencia del gen *fur* causa la acumulación intracelular del hierro y consecuentemente produce una hipersensibilidad al H_2O_2 . En los mamíferos el hierro absorbido en el intestino pasa a la **transferrina** del plasma sanguíneo. La transferrina tiene dos sitios de unión de Fe(III) de gran afinidad que normalmente sólo están ocupados menos del 20%, lo cual garantiza que todo el hierro esté unido. La transferrina interacciona con el receptor de transferrina y, por edocitosis, se forma una vacuola. Al acidificarse el interior de la vacuola el hierro se libera como Fe^{2+} y es captado por la ferritina en el citosol. La ferritina es una proteína de 24 subunidades que conforman una cápsula capaz de almacenar hasta 4,500 iones de metales de transición, la gran mayoría son Fe(III). Además, las células tienen **metalotioneínas** que son proteínas de bajo peso molecular con un alto contenido en cisteína (23–33%) y que son capaces de unir 5–7 iones de diferentes metales de transición. La sobreexpresión de una metalotioneína confiere a la célula una mayor resistencia celular para contender con la tensión oxidativa.

Cuando la concentración del hierro intracelular baja, la aconitasa citoplasmática pierde hierro de su centro $[4Fe-4S]$ y se transforma en una proteína reguladora del hierro (IRP-1). La **IRP-1** se une al ARNm del receptor de transferrina, estabilizándolo y favoreciendo su traducción y a la vez se une al ARNm de la ferritina, y de otras proteínas, impidiendo su traducción. Cuando hay suficiente hierro la IRP-1 se libera como aconitasa, lo cual desestabiliza el ARNm del receptor de transferrina y permite la traducción del ARNm de la ferritina y de otras proteínas, como la sintasa del ácido γ -aminolevulínico, que es la primera enzima de la síntesis del hemo.

El cobre, al igual que el hierro, es esencial y a la vez causa daño generando radicales. La **ceruloplasmina** del suero es una proteína, sintetizada principalmente por el hígado, que tiene seis sitios de unión de gran afinidad por el cobre. Para la incorporación del cobre a la célula, la ceruloplasmina se une a un receptor membranal responsable de su incorporación. Además, en el plasma sanguíneo la ceruloplasmina lleva a cabo una actividad de ferroxidasa ($4Fe^{2+} + O_2 + 4H^+ \rightarrow 4Fe(III) + 2H_2O$) que facilita la incorporación del hierro a la transferrina. Los pacientes que carecen de ceruloplasmina también tienen alteraciones del metabolismo del hierro.

Las hemoproteínas pueden causar daño cuando se encuentran fuera de su sitio fisiológico, por ejemplo por extravasación de la sangre o por lesiones en el músculo. En

presencia de O_2 , las hemoproteínas producen O_2^- y por ende H_2O_2 . El hemo se oxida con el H_2O_2 y se puede liberar junto con el hierro. El hemo, siendo hidrofóbico, se incorpora a las membranas y en presencia de luz genera 1O_2 ; el hierro libre genera $HO\cdot$ y así ambos contribuyen a la lipoperoxidación de las membranas celulares. En el plasma sanguíneo se encuentra una proteína, la **haptoglobina**, que une la hemoglobina. También se encuentra la **hemopexina** que, junto con la albúmina, une el hemo libre para su metabolismo en el hígado. El anillo pirrólico del hemo se rompe con la hemooxigenasa del retículo endoplásmico para producir bilirrubina y luego biliverdina por la acción de la reductasa de biliverdina en el citosol. Hay dos **hemooxigenasas** (HOx): la HOx-2, que es constitutiva, y la HOx-1, que se induce con la tensión oxidativa. La HOx-1 es la proteína del choque con calor HSP32. Se ha considerado que la bilirrubina puede ser un antioxidante pues es un buen desactivador del 1O_2 y de los radicales peroxilo. Una vez conjugada con el ácido glucurónico, la bilirrubina se secreta con la bilis para saponificar en el intestino los lípidos de la ingesta.

El tripéptido (glu-cys-gly) **glutati3n** (GSH) (Fig. 5) se sintetiza continuamente dentro de la célula y se degrada fuera de ella. Es el tiol celular más abundante; se mantiene a una concentración milimolar y es particularmente alta en el cristalino y en los eritrocitos de los mamíferos y en los cloroplastos de las plantas. El glutati3n tiene varias funciones: participa en la formación y ruptura de los puentes disulfuro de las proteínas, contribuye a desechar el H_2O_2 con la peroxidasa de glutati3n, es precursor de las **fitoquelatinas** en las plantas y es cofactor de algunas enzimas (9). Reacciona espontáneamente con el metilglioxal para transformarlo en lactato a través de las glioxalidas. El metilglioxal, que se forma por error, es reactivo y capaz de modificar las proteínas y los ácidos nucleicos. El glutati3n se utiliza también en el metabolismo de los xenobi3ticos a través de las **S-transferasas de glutati3n** que se encuentran en todos los eucariotas mas no en bacterias. Los xenobi3ticos son sustancias extrañas que se incorporan a la célula o que se producen por error o durante la tensión oxidativa, por ejemplo, aldehidos y peróxidos orgánicos. Las S-transferasas de glutati3n son enzimas diméricas pequeñas que conjugan los xenobi3ticos con el glutati3n para desecharlos o degradarlos (10). También metabolizan los peróxidos orgánicos formando alcoholes y disulfuro de glutati3n (GSSG) (reacción de peroxidasa). Hay una gran variedad de S-transferasas de glutati3n, algunas son citos3licas otras son membranales. Las citos3licas son también acarreadoras intracelulares de compuestos hidrof3bicos o potencialmente t3xicos como el hemo.

El glutati3n se mantiene casi todo en forma reducida principalmente a través de la **reductasa de glutati3n**, una flavoproteína que utiliza el NADPH como fuente de electrones (10). En la tensión oxidativa se forma gran cantidad de GSSG, que se secreta y se degrada (11). El glutati3n reacciona con el 1O_2 y con muchos radicales, aunque lo hace lentamente con el O_2^- . El radical tiilo que se forma se une a otro glutati3n y con el O_2 es capaz de formar O_2^- y disulfuro de glutati3n.

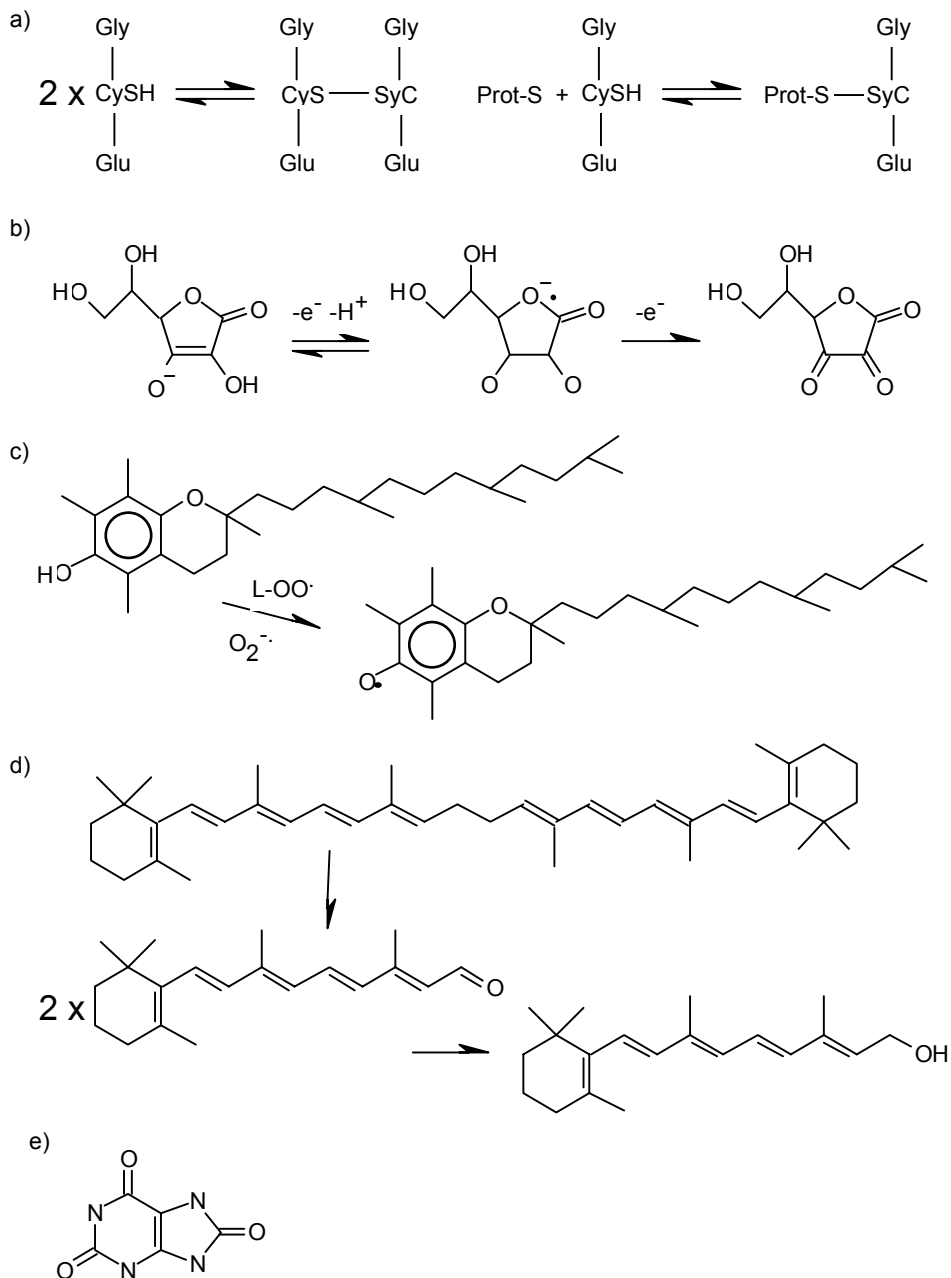


Figura 5. Los principales compuestos antioxidantes celulares: a) el glutati3n que se oxida formando disulfuro de glutati3n y que tambi3n puede formar disulfuros mixtos con las ciste3nas de las prote3nas; b) el ascorbato (vitamina C) acepta un electr3n de un radical (inestable) para formar el radical ascorbilo estable (monodeshidroascorbato) que puede aceptar un segundo electr3n para formar el dideshidroascorbato (inestable) que se degrada o se vuelve a reducir; c) α -tocoferol (vitamina E) en presencia de un radical (lip3dico) forma el radical tocoferilo que se puede reducir con ascorbato; d) el β -caroteno que a trav3s de una dioxigenasa genera dos mol3culas de retinal que se oxidan para formar el retinol (vitamina A); e) el urato proviene del catabolismo de purinas y se acumula en los primates debido a la ausencia de la oxidasa de urato.

Con la tensión oxidativa también aumentan los disulfuros mixtos que se forman entre el glutatión y las cisteínas de las proteínas u otros tioles libres. En estas condiciones se inhibe la síntesis de proteínas y la actividad de muchas proteínas. Con ayuda de algunas chaperonas (HSP) y de la **disulfuroisomerasa de proteínas** algunas proteínas pueden recuperar su conformación original, otras en cambio se degradan. La disulfuroisomerasa también tiene actividad de reductasa de dideshidroascorbato y además participa como las subunidades β de la hidroxilasa de prolina, que usa ascorbato como cofactor. La **tioltransferasa** o **glutarredoxina** también reduce los disulfuros de las proteínas utilizando glutatión y asimismo tiene actividad de reductasa de dideshidroascorbato.

Las plantas y muchos animales producen **ascorbato** (Fig. 5) a partir de la glucosa. En cambio los primates perdieron la última enzima de su biosíntesis, la oxidasa de la L-glucó- γ -lactona. Debido a que el ascorbato es cofactor de varias hidroxilasas, es un compuesto esencial para el hombre por lo que debe obtenerlo en su dieta, so pena de padecer escorbuto. El ascorbato o vitamina C se encuentra en la mayoría de frutas y vegetales. El ascorbato es muy soluble en agua y se encuentra en concentraciones altas en todos los tejidos, especialmente en el ojo y en el pulmón. Tiene dos hidroxilos ionizables que hacen de él un excelente agente reductor. Reduce el Fe(III), inclusive cuando está unido en algunas proteínas, también reduce aunque lentamente el O_2^- ($10^5 M^{-1} s^{-1}$), se utiliza para desechar el H_2O_2 por la peroxidasa de ascorbato, reacciona con el 1O_2 , el ácido hipoclorito, el $ONOO^-$, los radicales peroxilo y el radical tocoferilo. El radical ascorbilo (o monodeshidroascorbato) que se forma es estable y se puede desproporcionar espontáneamente regenerando el ascorbato y el dideshidroascorbato. Este último se descompone en ácido oxálico y ácido treónico o es reabsorbido y reducido por la glutarredoxina y el glutatión. El ascorbato es un excelente antioxidante siempre y cuando no esté en presencia de fierro o de cobre, pues en esas condiciones se genera el $HO\cdot$. Los complejos multivitamínicos incluyen muchas veces sales de fierro y ascorbato con lo cual generan $HO\cdot$ al disolverse.

El **tocoferol** (Fig. 5) o vitamina E es un compuesto esencial que el hombre obtiene de los aceites vegetales. Se absorbe junto con otras grasas formando parte de los quilomicrones. El tocoferol tiene tres carbonos asimétricos por lo que hay ocho estereoisómeros. El más activo de ellos es el RRR- α -tocoferol y en el hígado sólo éste se transfiere a las lipoproteínas de muy baja densidad (12). Éstas, al incorporar triglicéridos, se convierten en lipoproteínas de baja densidad que en el suero sanguíneo transfieren una parte del tocoferol a las lipoproteínas de alta densidad. Las células incorporan el tocoferol de las lipoproteínas a las membranas plasmáticas, sobre todo en los segmentos exteriores de los bastones de la retina. En los organismos fotosintéticos el tocoferol se concentra en las membranas de los tilacoides. Estos sitios nos indican la función antioxidante del tocoferol como desactivador y recolector del 1O_2 . El tocoferol reacciona con los radicales lipoperoxilo ($10^6 M^{-1} s^{-1}$) y el radical tocoferilo producido se puede reducir con el ascorbato ($10^6 M^{-1} s^{-1}$) y de esta manera se limita la propagación de la lipoperoxidación. El tocoferol, al igual que el ascorbato, puede reducir el Fe(III) y el Cu^{2+} por lo que puede ser prooxidante en presencia de estos metales de transición. La falta de tocoferol genera sensibilidad a la tensión oxidativa

que se traduce, por ejemplo, como hemólisis en presencia de H_2O_2 . El niño prematuro tiene poco tocoferol y por ello puede presentar hemólisis.

Muchos de los colores de las plantas y de los animales se deben a los **carotenos**. El hombre obtiene el retinol (vitamina A), que es esencial sobre todo para la visión, a partir del β -caroteno y de otros carotenos (Fig. 5). Los carotenos se parten en dos mediante la acción de una dioxigenasa para generar el aldehído retinal y éste es luego reducido a retinol. No todos los animales incorporan los carotenos. En el hombre los carotenos se concentran particularmente en el tejido adiposo, el hígado, el cuerpo lúteo, la glándula adrenal, la mácula de la retina y los testículos. Debido a las dobles ligaduras coordinadas que tienen son excelentes desactivadores del 1O_2 . En los organismos fotosintéticos sirven para absorber la luz y para desactivar el 1O_2 que se genera en este proceso. En el hombre también pueden tener esa función pues en la piel disminuyen los niveles de carotenos con la exposición a la luz. Los carotenos también reaccionan con los radicales peroxilo y el NO_2 , generando un radical estable que puede ser reducido por el ascorbato.

El hombre perdió la oxidasa de urato por lo que acumula **urato** (Fig. 5) en concentraciones cercanas a 0.5 mM. Los primates y otros animales excretan urato con la orina como producto de la degradación de los compuestos nitrogenados. La oxidasa de urato, al igual que la oxidasa de la L-glucó- γ -lactona en el caso de la síntesis del ascorbato, produce H_2O_2 y la pérdida de estas enzimas pudo haber representado para el hombre una ventaja más que una desventaja. Los genes inactivos de ambas enzimas se detectan en el genoma humano. El urato reacciona con el 1O_2 y con varios radicales generando el radical de urato, que es estable por resonancia electrónica y que se puede reducir con el ascorbato. Además, el urato forma quelatos con los metales de transición que no son reactivos. Debido a ello, se ha pensado que el ácido úrico puede funcionar como antioxidante en el hombre. De hecho en condiciones de tensión oxidativa el urato se oxida en alantoína. Sin embargo, el urato tiene la desventaja de que es poco soluble y, cuando hay una ingesta alta de compuestos nitrogenados que no se eliminan con suficiente rapidez en algunas personas, el urato se puede cristalizar en las articulaciones causando el síndrome de "la gota", además de que también puede formar cálculos renales.

Además de ascorbato, tocoferoles y carotenos, las plantas tienen una gran cantidad de **fenoles** que tienen actividad antioxidante *in vitro* (Fig. 6). Se ha especulado que estos fenoles del vino, del té, del café, etc. pueden tener una función antioxidante en el hombre. Pocos de estos fenoles se absorben en el intestino y aún no está claro su efecto en el hombre.

Las **melaninas** son productos de la polimerización de la dihidroxifenilalanina (Fig. 6), producida por las oxidasas de fenoles, como la tirosinasa, o del dihidroxinaftaleno (Fig. 6) generado por las sintasas de policétidos. Las melaninas son polímeros heterogéneos, insolubles, de elevado peso molecular. Tienen una gran cantidad de electrones desapareados, lo que les permite absorber la luz UV y la visible en todas las longitudes de onda. Por ello tienen un color muy oscuro. Además, son

capaces de reaccionar con cualquier especie reactiva funcionando como oxidantes o reductores. En el hombre las melaninas se forman a partir de la tirosina y se encuentran en el cabello, en el iris y en la sustancia niger en el cerebro. Varias bacterias y hongos son capaces de sintetizar melaninas que depositan en sus paredes celulares. Esto constituye un factor de virulencia de varios hongos patógenos de plantas y de animales.

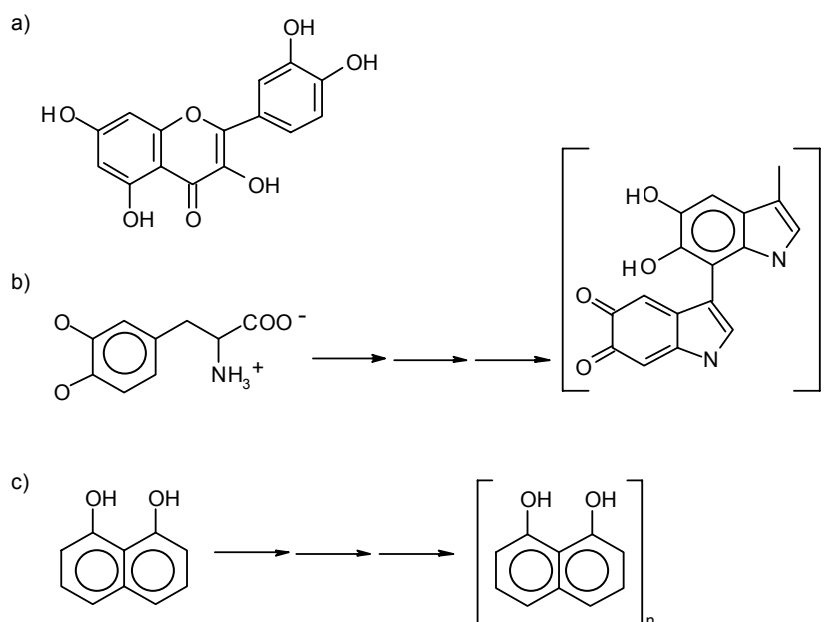


Figura 6. Fenoles como antioxidantes en la dieta y como precursores de las melaninas. a) La cuercetina es un flavonoide pentahidroxiado que está presente en muchas frutas y verduras. Éste y otros flavonoides de los vegetales pueden funcionar como antioxidantes. b) La dihidroxifenilalanina (DOPA) se oxida con la tirosinasa y genera dos productos que se polimerizan para formar una melanina que está presente en los animales y también en algunos hongos. c) El dihidroxinaftaleno (DHN) se forma de un pentacétido que se cicla y se reduce. El dihidroxinaftaleno se polimeriza y forma un tipo de melanina de algunos hongos.

Enzimas antioxidantes

A parte de las sustancias mencionadas, la mayoría de células tienen una batería de enzimas que desechan el O_2^- , el H_2O_2 y el NO^\cdot . El O_2^- sólo puede atravesar las membranas celulares como HO_2^- o a través de poros aniónicos. Es posible que debido a ello se requiera tener una dismutasa de superóxido (SOD) en cada compartimento celular limitado por una membrana. El H_2O_2 se produce principalmente por la dismutación del O_2^- pero también de muchas oxidasas que, tal vez por esa razón, se encuentran confinadas en vesículas, como los peroxisomas, glioxisomas, lisosomas, etc. Así la concentración local del H_2O_2 puede variar entre nanomolar y milimolar o

incluso cerca de 0.5 molar, dependiendo del sitio de su producción y de la célula o el tejido. Como el H_2O_2 es la mayor fuente de $^1\text{O}_2$ y del HO^\cdot , existe una gran redundancia de enzimas que desechan el H_2O_2 y que funcionan a diferentes concentraciones del mismo (Tabla 1). Finalmente, el NO^\cdot puede generar con el O_2 y el O_2^\cdot compuestos más reactivos por lo que es también importante desecharlo.

Tabla 1 Comparación de las constantes cinéticas de algunas enzimas que desechan el H_2O_2 .

| Enzima | K_M (mM) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) |
|-----------------------------------|---------------|---|---|
| Peroxirredoxina-Txn ^a | <0.06 | 0.2 – 10 | $10^3 - 10^5$ |
| Glutación peroxidasa ^b | 0.025 | 50 | 2×10^6 |
| Hemoperoxidasa (pl) ^b | 4 | 0.4 – 40 | $10^2 - 10^4$ |
| Hemoperoxidasa (an) ^b | -- | -- | $1 - 4 \times 10^7$ |
| Catalasa/peroxidasa ^c | 13 | 10^5 | 10^7 |
| Catalasa ^d | 20 | 9×10^6 | 4×10^8 |
| | 200 | 5×10^6 | 2×10^8 |

Las enzimas menos eficientes son las peroxirredoxinas y las más eficientes son las catalasas; las primeras funcionan a concentraciones muy bajas y las segundas a concentraciones muy altas de H_2O_2 . La diferencia en K_M puede ser de cuatro órdenes de magnitud. Algunas peroxidases tienen una eficiencia intermedia y funcionan a concentraciones intermedias de H_2O_2 .

^a Ref. 18;

^b citado en ref. 18;

^c ref. 28;

^d ref. 30.

Como su nombre lo indica, las dismutasas de superóxido dismutan el O_2^\cdot en H_2O_2 y O_2 y lo hacen de manera muy eficiente ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e independiente del pH. Esta reacción también ocurre espontáneamente pero depende del pH ($10^{5-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH fisiológico). Hay varios tipos de dismutasas de superóxido: las enzimas que tienen Cu^{2+} y Zn^{2+} en su sitio activo, que son intracelulares (CuZnSOD) o extracelulares (ECSOD), y las enzimas que tienen Mn(III) (MnSOD) o Fe(III) (FeSOD) en su sitio activo y que son citosólicas o de los organitos celulares. La **CuZnSOD** es un homodímero, abundante, azul verdoso, muy resistente a la desnaturalización, se inhibe con cianuro o con un quelante de cobre como el dietilditiocarbamato. El H_2O_2 inhibe la enzima *in vitro*. En la mayoría de los eucariotas la CuZnSOD es la principal actividad (13-16). Veinte por ciento de los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica familiar tienen mutaciones en el gen de la CuZnSOD. En las bacterias la CuZnSOD también está presente en el espacio periplásmico pero la actividad predominante en la bacteria es la MnSOD (15). En las mitocondrias la CuZnSOD se encuentra en el espacio intermembranal y la MnSOD en la matriz (16). El Cu^{2+} de la CuZnSOD, que está sostenido entre cuatro histidinas en un barril aplanado de ocho bandas- β plegadas

antiparalelas, lleva a cabo la transferencia de electrones mientras que el Zn^{2+} tiene un papel estabilizador. El canal que conduce al sitio activo tiene cargas negativas que repelen el O_2^- y lo conducen al interior que tiene cargas positivas. Las **ECSOD** son homotetrámeros mucho más grandes que las enzimas intracelulares. Son glicoproteínas de varios tipos, unas se unen a la superficie celular y otras no.

La **MnSOD** es un homodímero o tetrámero, de color rosa, que se desnaturaliza con detergentes o solventes y que no se inhibe con cianuro ni con el dietilditiocarbamato, ni tampoco con el H_2O_2 . En los eucariotes se encuentra en las mitocondrias, aunque algunos crustáceos sólo tienen esta enzima, tanto en el citosol como en las mitocondrias. *E. coli*, además de MnSOD, tiene otra enzima que une Fe(III) en vez de Mn(III) en su sitio activo. Aunque provienen de genes diferentes, estas dos enzimas son tan parecidas que pueden formar híbridos. En algunas plantas la FeSOD se encuentra en los cloroplastos.

En la última década se ha descubierto una familia de peroxidases que desechan el H_2O_2 y otros peróxidos a través de un sistema de oxidoreducción de grupos tioles (17, 18). El nombre genérico que se les ha dado es el de **peroxirredoxinas**, aunque a las enzimas en diversos organismos se les ha dado nombres muy variados. Son proteínas pequeñas, ubicuas, que tienen una cisteína conservada en el sitio activo. La unidad funcional es el dímero pero muchas son capaces de agruparse en decámeros de dímeros. Se encuentran en concentraciones relativamente altas dentro de las células, algunas son mitocondriales o cloroplásticas y otras se secretan. En términos generales estas enzimas son activas a bajas concentraciones de peróxidos (<0.1 mM) (18) (Tabla 1). Hay cinco subfamilias de peroxirredoxinas y cuatro de ellas tienen, además de la cisteína reactiva, otra cisteína conservada. Cada organismo tiene varias enzimas que provienen de algunas de estas subfamilias. Así, el hombre y el ratón tienen seis peroxirredoxinas, cuatro de una subfamilia y las otras dos de subfamilias distintas. *E. coli* tiene tres, cada una de distinta subfamilia. *Sacharomyces cerevisiae* tiene siete, cinco de una subfamilia y las otras dos de subfamilias distintas. Algunas peroxirredoxinas se inducen en condiciones oxidantes y las células mutantes sin una peroxirredoxina determinada son sensibles a la tensión oxidativa y en ocasiones también a las especies de nitrógeno reactivo.

La mayoría de la peroxirredoxinas dependen de la **tiorredoxina** como donador de electrones, aunque algunas pueden recibir electrones de otros tioles o de otras proteínas específicas que en una parte son semejantes a la tiorredoxina (18). La tiorredoxina también reduce los puentes disulfuro de otras proteínas. El peróxido, al interactuar con el tiolato de la cisteína del sitio activo genera un sulfénico como intermediario y libera una molécula de agua (o de alcohol, en el caso de los alquilhidroperóxidos). El sulfénico es inestable debido a la vecindad de un sulfhidrilo de la misma subunidad por lo que se genera un puente disulfuro y se libera otra molécula de agua o alcohol. El puente disulfuro se reduce a través de dos disulfuros vecinos de la tiorredoxina (o una proteína semejante). El puente disulfuro generado en la tiorredoxina se reduce a través de dos sulfhidrilos de la **reductasa de tiorredoxina** (19). El puente disulfuro formado en la reductasa de tiorredoxina se reduce con los

electrones provenientes del NADPH a través de una flavina (FAD) unida a esta enzima. En resumen, el peróxido se reduce con los electrones del NADPH a través de una cadena de sulfhidrilos/disulfuros (Fig. 7). La reductasa de tiorredoxina también reduce la isomerasa de disulfuros de proteína.

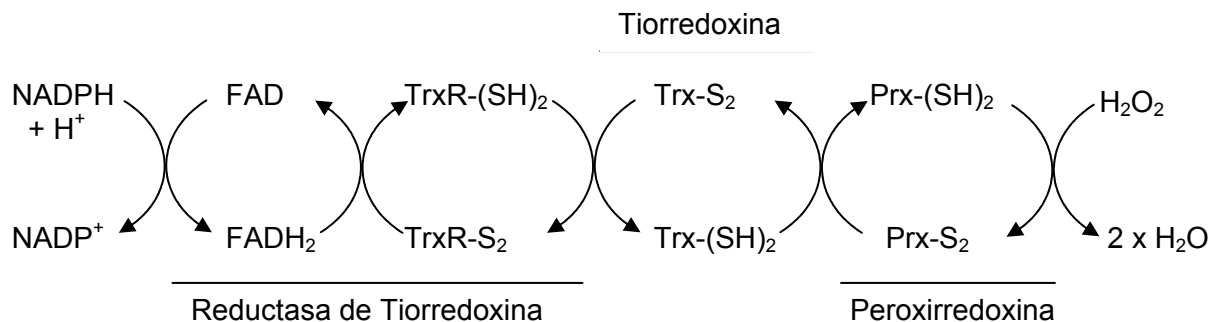


Figura 7. Cadena de oxidoreducción de los tioles vecinos entre varias proteínas. Las peroxirredoxinas (Prx) reducen el H_2O_2 con un par de cisteínas de su sitio activo. La mayoría de estas enzimas utilizan la tiorredoxina (Trx) para volver a reducir el disulfuro formado. La tiorredoxina a la vez requiere de la reductasa de tiorredoxina (TrxR) para lo mismo. Esta última enzima reduce sus cisteínas con los electrones que obtiene del NADPH a través del FAD unido a la enzima.

La **peroxidasa de glutatión** (GPx) reduce los hidroperóxidos utilizando glutatión como agente reductor, aunque las de hidroperóxidos de fosfolípidos pueden utilizar tiorredoxina, glutaredoxina o tioles proteicos como fuente de poder reductor. Se han descrito peroxidases de glutatión en los animales, en las plantas, en los esporozoarios, en algunas algas, hongos y bacterias. *S. cerevisiae* tiene tres genes de peroxidasa de glutatión. Los mamíferos tienen varias peroxidases de glutatión: la citosólica (GPx1), la gastrointestinal (GPx2), la plasmática (GPx3) y la de hidroperóxidos de fosfolípidos (GPx4) (20). Son homotetrámeros con la excepción de la GPx4 que es un monómero de tamaño menor al de las subunidades de las otras glutatión peroxidases. La GPx de hidroperóxidos de fosfolípidos es capaz de actuar sobre los fosfolípidos de las membranas celulares y de las lipoproteínas, además de los hidroperóxidos de timina y de ésteres de colesterol. Además, esta enzima se requiere durante la espermatogénesis para oxidar los tioles de las proteínas que estabilizan la cápsula que contiene las mitocondrias del espermatozoide (21). También se requiere de otra enzima similar pero con un extremo N-terminal distinto y rico en argininas, resultado de un ensamble alternativo de exones ("splicing"). Esta enzima oxida las cisteínas de la protamina que condensa la cromatina del espermatozoide (22). Todas las GPx son capaces de reducir el H_2O_2 y los hidroperóxidos de ácidos grasos; sin embargo, la GPx plasmática también lo hace con lípidos complejos, como el hidroperóxido de fosfatidilcolina o hidroperóxidos en algunas proteínas como la tiorredoxina. La GPx citosólica es la enzima más abundante sobre todo en los eritrocitos, el hígado, los riñones y los pulmones. La GPx plasmática no sólo está en el plasma sanguíneo sino

que en la mayoría de secreciones corporales. Se sintetiza en el riñón y de ahí es liberada a la sangre. La GPx gastrointestinal sólo se encuentra en el epitelio del tracto digestivo y en el hígado.

En los mamíferos estas enzimas tienen la particularidad de tener en su sitio activo una **selenocisteína**, una cisteína en la cual el azufre ha sido reemplazado por el Se. La selenocisteína está codificada por el codón de terminación UGA pero el mecanismo de traducción reconoce una determinada conformación del ARNm e introduce en ese codón un ARNt con una serina transformada enzimáticamente en selenocisteína. El Se está como selenol y reacciona con el H_2O_2 para formar ácido selénico y agua, o alcohol en el caso de los alquilperóxidos. El glutatión reacciona con el ácido selénico para formar otra molécula de agua y una segunda molécula de glutatión reacciona con el glutatión unido para formar disulfuro de glutatión. Hay otras proteínas con selenocisteína como la reductasa de tiorredoxina que tiene selenocisteína como penúltimo aminoácido, las 5-desyodinasas de yodotironina que generan la 3,5,3'-triyodotironina y la proteína P del plasma humano que tiene 10 selenocisteínas por molécula. También se han detectado selenoproteínas en procariotos y recientemente en plantas (23).

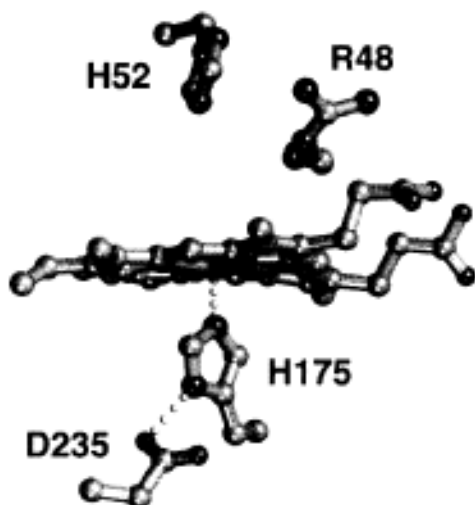
Las hemoperoxidasas se pueden dividir en la superfamilia de los animales, la superfamilia de plantas, hongos y procariotos y en un grupo menor de las haloperoxidasas. Estas enzimas difieren entre sí en su estructura primaria, secundaria y terciaria por lo que se piensa que representan familias de genes diferentes. Las **hemoperoxidasas de animales**, como la peroxidasa de la tiroides, la lactoperoxidasa, la peroxidasa salival, la mieloperoxidasa y la peroxidasa de los eosinófilos son proteínas grandes (>700 aminoácidos), tienen el hemo unido covalentemente y tienen sitios para unir Ca^{2+} (24). La peroxidasa de la tiroides une los átomos de yodo de las hormonas tiroideas. La lactoperoxidasa de la leche junto con la peroxidasa de la saliva son capaces de oxidar iones de tiocianato a hipotiocianato que es tóxico para algunos microorganismos. La mieloperoxidasa se encuentra en las células fagocíticas y genera ácido hipocloroso (hipoclorito) (HOCl) a partir de Cl^- y H_2O_2 y la de los eosinófilos produce ácido hipobromoso. El HOCl y el HOBr contribuyen a matar a los microorganismos fagocitados.

Las **hemoperoxidasas de plantas, hongos y procariotos** tienen similitud en la secuencia de sus aminoácidos, particularmente en sus dominios catalíticos, y en su estructura. Difieren de las enzimas de animales en que éstas son proteínas pequeñas (300 aminoácidos) y su hemo no está unido covalentemente. Sin embargo, las dos familias de hemoperoxidasas tienen una His y una Arg conservadas en el sitio activo y una His que hace un enlace de coordinación con el Fe(III) y un puente de hidrógeno con una Asn o un Asp en el lado proximal (25), lo que constituye un ejemplo de evolución convergente (Fig. 8). La peroxidasa del citocromo *c* de *S. cerevisiae* forma una cavidad con diez hélices- α que contiene el hemo. Esta estructura se conserva en las peroxidases del ascorbato y la peroxidasa de la raíz fuerte. La peroxidasa de ascorbato tiene la función de eliminar el H_2O_2 que se forma en el fotosistema I de las plantas (26). La superfamilia se ha dividido en tres clases con base en sus

características estructurales. La clase I incluye la peroxidasa del citocromo *c* de *S. cerevisiae*, las peroxidasas de ascorbato de las cianobacterias, las algas y las plantas, y las catalasas/peroxidasas de los procariotos y de los hongos. Esta clase de peroxidasas probablemente tenga un origen procarioto. La clase II comprende las peroxidasas extracelulares de los hongos, las peroxidasas de lignina y las peroxidasas de Mn. La clase III incluye las peroxidasas de secreción de las plantas, como la peroxidasa de la raíz fuerte y muchas otras que se secretan. Las clases II y III de las peroxidasas están glicosiladas, tienen puentes disulfuro, tienen un péptido señal y unen calcio. La mayoría de los aminoácidos del sitio activo son invariables; sin embargo, la afinidad y las propiedades cinéticas de estas enzimas son muy diferentes. Algunas son específicas para el sustrato que utilizan, como el citocromo *c* o el ascorbato; otras utilizan un espectro amplio de agentes reductores, como la peroxidasa de la raíz fuerte, que es capaz de oxidar amidas, fenoles, indoles y sulfonatos. La peroxidasa de lignina es capaz de utilizar veratrilol y la peroxidasa de Mn cataliza la oxidación del Mn(II) a Mn(III). El producto de ambas enzimas puede a su vez oxidar y degradar compuestos fenólicos como la lignina. Las plantas pueden tener hasta nueve genes de peroxidasas distintas que se utilizan para diferentes funciones como la lignificación de la pared celular, la suberización de los tejidos lesionados o el catabolismo de algunas hormonas. La peroxidasa de ascorbato es la principal actividad antioxidante de muchos organismos como *Euglena* que carecen de catalasa o de otras peroxidasas. También está presente en otros protistas y en cianobacterias.

Las **catalasas/peroxidasas** son enzimas capaces de llevar a cabo eficientemente tanto la reacción de catalasa como de peroxidasa. La K_m aparente para su actividad de catalasa es diez veces menor que la de las catalasas monofuncionales (27) (Tabla 1). A diferencia de éstas, el grupo hemo de las catalasas/peroxidasas está cerca de la superficie de la enzima por lo que sí puede ser reducido con ditionita. Estas enzimas muestran un pH óptimo para ambas actividades, se inactivan con solventes orgánicos, son más sensibles que las catalasas monofuncionales a la temperatura y son más resistentes a la inhibición con 3-amino-1,2,4-triazol. Las catalasas/peroxidasas están compuestas por dos mitades que son semejantes entre sí y ambas, particularmente la del N-terminal, tienen similitud con la secuencia de aminoácidos de la peroxidasa de citocromo *c* de *S. cerevisiae*. Se piensa que las catalasas/peroxidasas se originaron por la duplicación del gen de una peroxidasa semejante a las de la superfamilia de las plantas (28). Es probable que las catalasas/peroxidasas de los hongos tengan un origen bacteriano (27). No hay similitud entre la secuencia de las catalasas/peroxidasas y las catalasas monofuncionales. Las catalasas/peroxidasas de las plantas, a diferencia de las de bacterias y de hongos, son incapaces de usar como sustratos la *o*-dianisidina y el guaiacol.

peroxidasa del citocromo c



mieloperoxidasa

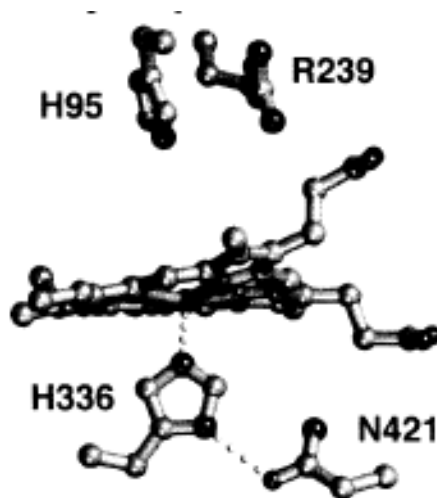


Figura 8. Coevolución en las familias de las hemoperoxidasas. Comparación del sitio activo de la citocromo c peroxidasa de *S. cerevisiae*, representante de la familia de las hemoperoxidasas de plantas, hongos y procariotos, y la mieloperoxidasa, representante de la familia de hemoperoxidasas de los animales. En ambas enzimas se utilizan los mismos aminoácidos para la reacción catalítica aunque éstos provienen de diferentes regiones dentro de la proteína. La imagen se tomó de la figura 2 de la referencia 24.

Se ha encontrado **haloperoxidasas** en algunos hongos, en líquenes y en algas que tienen un vanadato (HVO_4^{2-}) unido covalentemente a una histidina del sitio activo (29). Algunas haloperoxidasas de vanadio tienen también actividad de fosfatasa y se piensa que hayan provenido de un gen para una fosfatasa ácida.

Las **catalasas monofuncionales** dismutan el H_2O_2 en O_2 y H_2O y lo hacen con una gran eficiencia a cualquier pH entre 4 y 11. Son enzimas muy resistentes a agentes desnaturizantes y solventes orgánicos. Se inactivan con 3-amino-1,2,4-triazol y, como todas las hemoproteínas, se inhiben con cianuro y azida (30). Las catalasas tienen un origen común y se encuentran desde las arqueas hasta los mamíferos. En términos generales su secuencia y estructura están conservadas e inclusive en plantas se ha descrito la hibridación entre varias catalasas. Son homotetrámeros u homodímeros de subunidades de ≈ 60 kDa o de ≈ 80 kDa. Hay varios subgrupos de catalasas: uno de plantas, uno de animales, uno de hongos, dos de bacterias y uno de bacterias y hongos en donde se encuentran las catalasas grandes (31). Cada subunidad contiene una ferro-protoporfirina-IX (hemo *b*) o derivados del mismo, como

el hemo *d* o una clorina (7). El hemo por sí solo cataliza la dismutación del H_2O_2 aunque con mucha menor eficiencia que la catalasa. El dominio del barril- β , que incluye la cavidad del hemo, los aminoácidos que lo orientan y el canal que conduce a él, es la parte más conservada de la molécula (32) (Fig. 9). Las catalasas monofuncionales tienen un canal estrecho que conduce a la parte distal del hemo en donde una histidina y una asparagina participan en la reacción junto con el Fe(III) y el hemo. El Fe(III) no tiene enlace de coordinación en la parte distal y en la parte proximal el enlace es con una tirosina muy conservada. El canal estrecho y la falta de coordinación del Fe(III) en el lado distal tienen que ver con la selectividad por el H_2O_2 de estas enzimas, aunque también son capaces de oxidar algunas moléculas pequeñas, como formato, metanol o etanol (actividad de peroxidasa). Al entrar un H_2O_2 al sitio activo toma un electrón del hierro y otro del hemo para generar una molécula de agua y el compuesto I, que consiste en un ferroxilo y un radical porfirínico catiónico. Una segunda molécula de H_2O_2 cede un electrón al ferroxilo y otro al hemo, restituyendo el estado inicial de la enzima y liberando una molécula de dióxigeno y otra de agua. El compuesto I también se forma en las hemoperoxidasas. Pero en estas enzimas la reducción del compuesto I ocurre en dos pasos: un compuesto reductor cede un electrón al compuesto I para formar el compuesto II y con una segunda molécula de reductor lo reduce al estado inicial. Algunas catalasas pequeñas pueden unir NADPH que posiblemente evita la generación del compuesto II inactivo (33). En cambio, las catalasas grandes no pueden unir NADPH debido a que tienen un dominio adicional en el extremo C-terminal similar al de la flavodoxina cuya función se desconoce (32) (Fig. 9).

Muchos microorganismos anaerobios y termofílicos carecen de hemoproteínas pues son incapaces de sintetizar el grupo hemo. Sin embargo, algunos de ellos tienen enzimas con actividad de catalasa. Estas **pseudocatalasas** en vez del grupo hemo tienen dos átomos de Mn en su centro catalítico (34). Son homooligómeros y sus secuencias de aminoácidos no tienen similitud con las otras catalasas.

La mayor parte del $\text{NO}\cdot$ que se produce en los tejidos de los mamíferos se une a la hemoglobina o a la mioglobina. Sin embargo, muchos microorganismos y también las plantas tienen hemoglobinas. La función de algunas de estas proteínas es la de unir O_2 y posiblemente liberarlo conforme se vaya requiriendo, como la leghemoglobina que rodea los nódulos en donde las especies de *Rhizobium* en simbiosis con la planta llevan a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico. Sin embargo, recientemente se ha visto que unas hemoglobinas que tienen FAD unido, las **flavohemoglobinas**, se inducen con el $\text{NO}\cdot$ además de con el O_2 . Estas proteínas sirven posiblemente para desechar el $\text{NO}\cdot$ (35). El FAD de estas proteínas recibe los electrones del NADH para reducir 2O_2 en 2O_2^- y éstos se combinan con $2 \text{NO}\cdot$ para formar 2NO_3^- , en vez de 2ONOO^- que se formarían de manera espontánea.

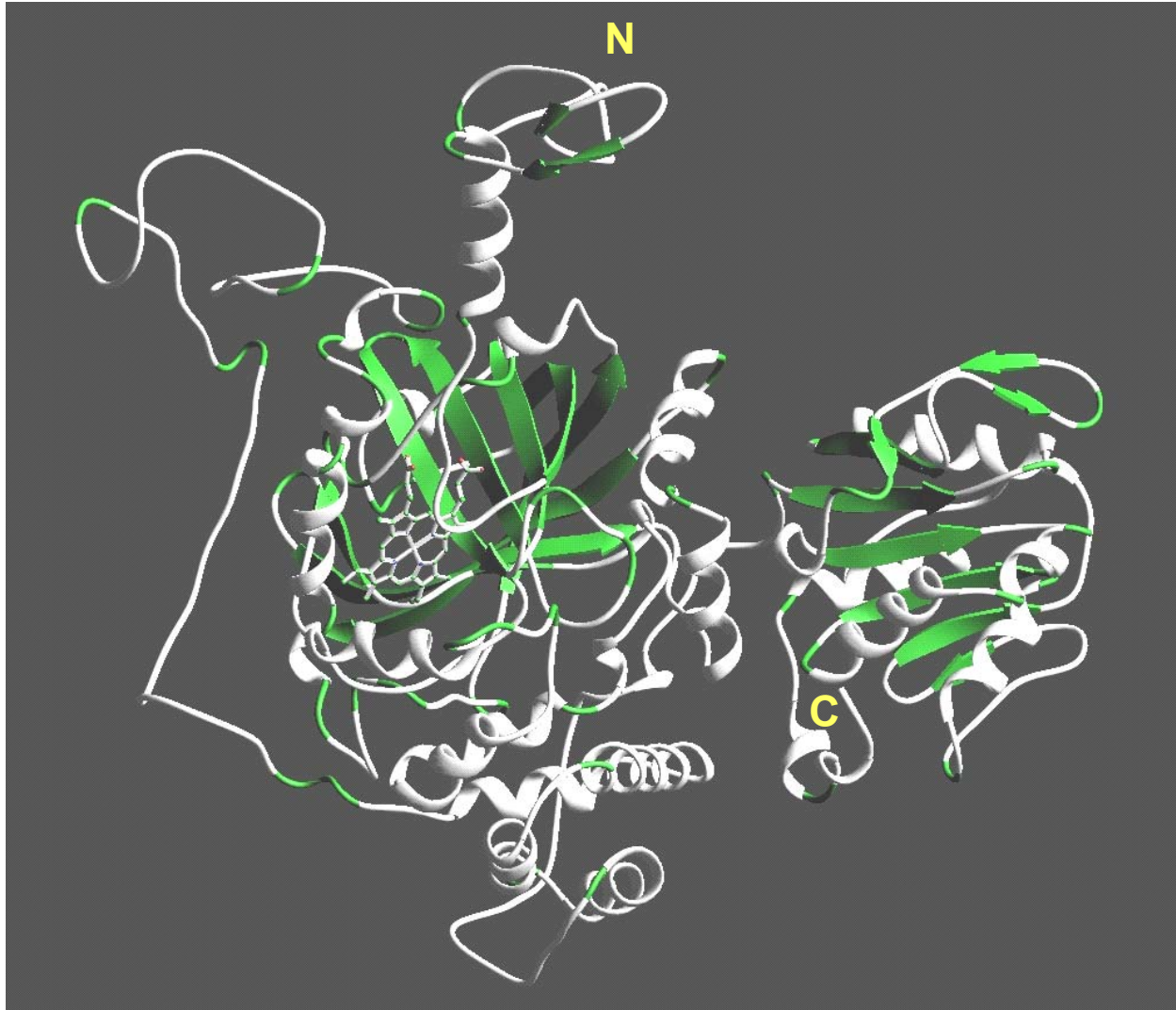


Figura 9. Estructura cristalográfica del monómero de la catalasa-1 de *N. crassa*. La estructura tiene una resolución de 1.75 Å. En la imagen se aprecia el amino terminal (N), un asa envolvente, la cavidad del hemo y el dominio del carboxilo terminal (C) que es semejante al dominio de la flavodoxina. Las catalasas pequeñas no tienen este último dominio. Tomado de Díaz A, Rudiño E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W, manuscrito en preparación.

Las enzimas que producen especies de oxígeno reactivas

En las células, las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas están generando continuamente productos de oxidación y de nitratación que se pueden detectar en los sitios que se producen o como productos que se desechan. Esto se debe en parte a que no se puede evitar totalmente la generación del HO \cdot y el $^1\text{O}_2$ ni prever el sitio en donde se van a producir. Pero también la evidencia apunta cada vez más a que las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas tienen funciones específicas. Tal es el caso

de la participación del H_2O_2 en la síntesis de la hormona tiroidea y en la maduración y capacitación de los espermatozoides; el NO^\cdot en la vasodilatación en los mamíferos; en la formación de la envoltura de fertilización en el erizo de mar; en la formación de lignina y el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular en los sitios de invasión de los microorganismos en el caso de las plantas. Por otro lado, las especies de oxígeno reactivas generan mutaciones y éstas son la base del proceso evolutivo.

Los organismos no sólo tienen enzimas para desechar las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas sino que también tienen enzimas que producen O_2^\cdot y NO^\cdot y ácidos hipohalogenosos, además de las oxidasas que producen H_2O_2 . La **oxidasa de NADPH** es una enzima que se encuentra en muchas células y que produce 2O_2^\cdot a partir de 2O_2 y NADPH como donador de electrones. Las enzimas que más se han estudiado son las que se activan cuando algún microorganismo invade el organismo, como la responsable de la llamada explosión oxidativa en los leucocitos de los mamíferos y en las plantas (36). Sin embargo, las oxidasas de NADPH también se encuentran en otras células como los fibroblastos, las células del músculo liso vascular, los condrocitos y en las células tiroideas, en donde se genera H_2O_2 para la yodinación de la hormona tiroidea. Se han detectado oxidasas de NADPH en peces e insectos. En el genoma de *N. crassa* se encuentran dos $p91^{\text{phox}}$ (www.genome.wi.mit.edu) y se ha aislado y cancelado un gen de una oxidasa de NADPH en *Aspergillus nidulans* (J. Aguirre, comunicación personal).

La enfermedad granulomatosa crónica es un padecimiento hereditario en el cual los pacientes carecen de la actividad de oxidasa de NADPH, por lo que son muy susceptibles a padecer infecciones microbianas. El estudio de estos pacientes ha revelado una buena parte de lo que se sabe de la enzima de los leucocitos (36). Ante un determinado estímulo (aniones anfífilicos, como el ácido araquidónico, los lipopolisacáridos, el péptido bacteriano formil-Met-Leu-Phe-Lys, la menadiona, el leucotrieno B₄, los ésteres de forbol y el ácido fosfatídico), la enzima se activa cuando las subunidades citosólicas $p47^{\text{phox}}$ y $p67^{\text{phox}}$ se ensamblan con las subunidades membranales $p91^{\text{phox}}$ y $p22^{\text{phox}}$ que conforman el citocromo b_{558} . Para que la subunidad $p67^{\text{phox}}$ citosólica se pueda ensamblar con el citocromo b_{558} membranal, la proteína GTP-Rac1 (o Rac2) debe desplazar a la proteína $p40^{\text{phox}}$ en su unión con la $p67^{\text{phox}}$. La unión de la $p67^{\text{phox}}$ a Rac es regulada por fosforilación que ocasiona la exposición de un dominio de unión SH3 en $p67^{\text{phox}}$. La subunidad citosólica $p47^{\text{phox}}$ también requiere que se fosforile para unirse a la subunidad $p22^{\text{phox}}$ membranal a través de un dominio SH3. Tanto Rac como $p47^{\text{phox}}$ sirven como acarreadores de $p67^{\text{phox}}$ a la membrana (37). Cuando Rac está prenilado y se incorpora a la membrana ya no se requiere $p47^{\text{phox}}$. La activación depende de la cinasa de proteína C (PKC) y de una fosfatasa de tirosina y también de la presencia de iones Mg^{2+} y Ca^{2+} y de calmodulina. La subunidad membranal $p91^{\text{phox}}$ tiene un sitio de unión para el NADPH, para una flavina y para dos hemos. El NADPH cede electrones a la flavina y de ahí se piensa que los electrones pasan a los hemos y finalmente al O_2 . Como hay un transporte de electrones hacia afuera de la célula, para equilibrar las cargas se requiere acoplar la actividad de la oxidasa de NADPH con un canal de protones de la misma enzima localizado en $p91^{\text{phox}}$. Cuando se activa esta enzima hay un incremento en el flujo de la

vía de las pentosas para producir suficiente NADPH. Hay dos familias de NADPH oxidasas: la familia NOX, cuyas proteínas tienen 560-580 aminoácidos, y la familia DUOX, que son mucho más grandes, de 1550 aminoácidos. La oxidasa de NADPH de las células endoteliales (NOX1 y NOX4) genera mucho menos O_2^- que la de las células fagocíticas y el mecanismo de activación es diferente ya que la enzima está ensamblada y unida al citoesqueleto (38). Recientemente se ha descrito otra oxidasa de NADPH (NOX5), que se presenta en dos formas por un ensamble alternativo ("splicing"), una de ellas es específica de los espermatozoides y la otra del bazo y los nódulos linfáticos. Esta enzima se activa con calcio y es también un canal de protones (39). En las plantas la NADPH oxidasa se activa con la invasión de un microorganismo (40) y al parecer no requiere la activación de proteínas citosólicas (41).

Las células fagocíticas no solamente generan O_2^- a través de la oxidasa de NADPH sino que simultáneamente la sintasa del óxido nítrico produce $NO\cdot$ y la mieloperoxidasa sintetiza HOCl a partir del Cl^- y el H_2O_2 y, en los eosinófilos, la bromoperoxidasa produce ácido hipobromoso. El O_2^- junto con el $NO\cdot$ pueden generar $ONOO^-$ y los ácidos hipohalogenosos son capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno y formar 1O_2 . Este coctel de oxidantes inicialmente está dirigido contra el microorganismo fagocitado pero muchas veces acaba por afectar a los propios fagocitos y a las células vecinas.

En algunos casos se ha observado que la enzima deshidrogenasa de xantina, que cataboliza la xantina en hipoxantina y luego en urato, se modifica en sus grupos sulfhidrilos y se proteoliza convirtiéndose en una **oxidasa de xantina** (42). La oxidasa en vez del NAD^+ utiliza como aceptor de electrones el O_2 para formar O_2^- . Esta transformación enzimática se ha detectado en los experimentos de isquemia y reperfusión (hipoxia(anoxia)/ reoxigenación) y explica en parte las especies de oxígeno reactivas que se forman durante la reoxigenación.

La **sintasa del óxido nítrico** (NOS) genera óxido nítrico a partir del grupo guanidino de la arginina. En presencia de 2 O_2 y de 2 NADPH, la enzima transforma la arginina en citrulina y $NO\cdot$. Los mamíferos tienen tres isoenzimas, dos de ellas son relativamente constitutivas y otra es inducible. Todas requieren de la calmodulina para su activación pero sólo las primeras dependen de la concentración de Ca^{2+} (43). Las células fagocíticas activadas producen una gran cantidad de $NO\cdot$. En los vasos sanguíneos el $NO\cdot$ liberado por el endotelio vascular es dos o tres órdenes menor que el de los macrófagos. Este $NO\cdot$ se difunde y se une al hemo de la ciclasa de guanilato del músculo liso vascular. La enzima se activa produciendo GMP cíclico, el cual induce una disminución en los niveles de Ca^{2+} de los miocitos. Los bajos niveles de Ca^{2+} producen una relajación de las fibras musculares que se traduce macroscópicamente en una vasodilatación. El efecto de la nitroglicerina y de otros nitróxidos, que se han usado desde hace un siglo para la angina de pecho, es precisamente la vasodilatación de las arterias coronarias a través de la producción del $NO\cdot$.

Las especies de oxígeno reactivas en la proliferación y muerte celular y en la senectud de los organismos

El efecto metabólico causado por la unión de la insulina con su receptor membranal se puede obtener con cantidades pequeñas de H_2O_2 . Concentraciones bajas de H_2O_2 (1 μM) causan un aumento de la proliferación celular en células en cultivo. En cambio, concentraciones más altas de H_2O_2 (100 μM) detienen el ciclo celular. Estos cambios son reversibles e involucran la oxidación de puentes de disulfuro, la liberación de Ca^{2+} intracelular y la activación de cinasas de proteínas. Concentraciones aún más altas pueden causar la muerte celular por apoptosis en algunos cultivos celulares y aún más altas la muerte por necrosis.

La concentración extracelular del **Ca^{2+} libre** en los mamíferos es de 1 mM y la concentración citosólica del Ca^{2+} libre es de $\approx 0.1 \mu\text{M}$. La mayor parte del Ca^{2+} celular está secuestrado en el retículo endoplásmico, en las mitocondrias o unido a proteínas (anexina VI). Los transportadores de Ca^{2+} en estos organitos y en la membrana plasmática mantienen el nivel bajo de Ca^{2+} citosólico utilizando energía. La unión de algunas moléculas con sus receptores membranales, así como la tensión oxidativa moderada, produce un aumento transitorio del Ca^{2+} libre, lo cual genera una cascada de señales intracelulares (44). La unión de un efector con su receptor puede activar una proteína G trimérica y ésta a la vez activar la fosfolipasa C. El receptor también puede ser una cinasa de proteína en tirosina/serina o estar acoplado a una cinasa de proteína que activa a otra fosfolipasa C. Las fosfolipasas C actúan sobre el fosfofosfatidilinositol de la membrana celular generando trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El trifosfato de inositol activa los canales de Ca^{2+} del retículo endoplásmico que liberan el Ca^{2+} . El diacilglicerol activa la cinasa de proteína C (PKC) que, en presencia del Ca^{2+} , fosforila algunas serinas y treoninas de ciertas proteínas. El Ca^{2+} también se une a la calmodulina y le produce un cambio conformacional que permite su unión a otras proteínas lo que causa la activación de algunas cinasas de proteína, las NOS y la oxidasa de NADPH. El Ca^{2+} también activa la fosfolipasa A_2 que libera ácido araquidónico de las membranas. Todo ello contribuye a regular una respuesta metabólica a nivel de la transcripción de genes y la traducción de ARNm que se puede manifestar, por ejemplo, en proliferación celular o en la detención del ciclo celular. El trifosfato de inositol y el diacilglicerol se degradan rápidamente y las fosfatasas restituyen el estado inicial de las proteínas con lo cual la célula puede recibir otras señales.

El receptor cinasa de proteína puede estar asociado también con una proteína G pequeña, como Rac (Rac-1 y Rac-2), que a la vez desencadena una cascada de fosforilación que finalmente fosforila y activa un factor de transcripción. Las fosfatasas tienen una cisteína en su sitio activo que requieren para unir el fosfato. Debido a que la actividad de las fosfatasas es mucho mayor que la de las cinasas, es posible que se necesiten las especies de oxígeno reactivas para inhibir de manera transitoria las fosfatasas y así se pueda llevar a cabo la cascada de fosforilación. Rac-1 tiene varias funciones relacionadas con las especies de oxígeno reactivas: se requiere para activar la oxidasa de NADPH, conduce a la activación de la cinasa del N-terminal de c-Jun

(JNK) que activa los factores de transcripción en los que participa c-Jun, conduce a la activación del NF- κ B y activa la fosfatasa A₂ (45, 46). La sobreexpresión de algunas peroxirredoxinas o de la catalasa anula la cascada de fosforilación que desencadena la unión del factor de crecimiento epidermal (EGF) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) con sus receptores específicos (17, 45, 46).

Las células animales expuestas a una concentración de oxígeno elevada o a una tensión oxidativa transcriben los genes de las proteínas del choque con calor, las llamadas proteínas reguladas por glucosa, la hemoxigenasa-1, la colagenasa, algunas moléculas de adhesión (ICAM-1) y algunas citocinas (TNF, IL-2, IL-6, IL-8), además de la catalasa, la glutatión peroxidasa, la tioredoxina y a veces la MnSOD. Los factores de transcripción activados durante la tensión oxidativa son el NF- κ B, el AP-1 y el AP-2 (47, 48). La actividad del NF- κ B (48, 49) y del AP-1 (50), al igual que el factor de transcripción en bacterias OxyR (51), depende del estado redox de una o dos cisteínas críticas. En el caso del NF- κ B la tioredoxina puede reducir una cisteína para que el factor se pueda unir al ADN (48). La endonucleasa que repara los sitios sin base (sitios AP) (APE/HAP-1) es al mismo tiempo el factor redox Ref-1 que también reduce las cisteínas de AP-1, NF- κ B, Erg-1 y p53 para que éstos se puedan unir al ADN (52). Asimismo se ha descrito la regulación de algunos canales de Ca²⁺ y de K⁺ por el estado redox del GSH/GSSG (53). La tensión oxidativa también activa la expresión de p21 que determina la detención del ciclo celular.

Cuando hay **hipoxia** se inducen muchos genes que, en este caso, están relacionados con el metabolismo del carbono y del hierro y con la proliferación celular y la generación de vasos sanguíneos. El factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), que es responsable de la expresión de estos genes, está regulado tanto a nivel de su degradación como de su activación por una hidroxilasa de prolina y otra de asparagina que sirven como sensores de oxígeno: cuando falta oxígeno no llevan a cabo la hidroxilación del HIF por lo cual éste se activa y no se degrada (54). La tensión oxidativa a través de Rac-1 también activa dicho factor (55), posiblemente inactivando la hidroxilasa de prolina que requiere ascorbato y hierro para su actividad (56).

La **apoptosis** es un proceso de muerte celular ordenado que no afecta a las células vecinas. La activación del proceso es debida a una tensión oxidativa muy acentuada o prolongada. Cuando el Ca²⁺ citosólico aumenta de manera prolongada, las mitocondrias se llenan de Ca²⁺. El ácido araquidónico liberado por la fosfolipasa A₂ desacopla las mitocondrias, éstas se hinchan y comienzan a liberar compuestos mitocondriales, entre ellos el citocromo c. En un determinado momento se pierde el control de la permeabilidad mitocondrial y se libera el Ca²⁺ de las mitocondrias junto con otros compuestos. La ciclosporina A, al bloquear el poro de la transición de la permeabilidad, evita que se pierda dicho control. Bcl-2 forma canales mitocondriales que tienden a mantener el potencial de membrana y además sujeta a la proteasa (Apaf-1) unida a la caspasa 3. Cuando Bax, otra proteína que forma canales, se incorpora a la membrana mitocondrial se propicia el colapso del potencial de membrana y de la permeabilidad mitocondrial. La familia de proteínas de Bcl-2 consta de ocho proteínas antiapoptóticas y nueve proapoptóticas. Con la salida del citocromo

c, la cadena respiratoria ya no puede reducir el O_2 en $2 H_2O$ sino que sólo produce O_2^- . El citocromo c y el ATP propician la activación de Aptf-1 y el procesamiento del zimógeno de la caspasa-3. El citocromo c y el ATP también activan la caspasa-9 (Apaf-3) (57). El Ca^{2+} además activa otra proteasa, la calpaína, que degrada las proteínas de unión de la actina con la membrana celular con lo cual se disocian los microfilamentos. El resultado de esta acción es la formación de globos membranales (blebs) que incluso se desprenden de la célula y cuya ruptura puede causar una necrosis celular. La actividad de la calpaína puede transformar la deshidrogenasa de xantina en oxidasa y generar aún más O_2^- . El O_2^- puede causar la liberación de hierro de los centros [Fe-S] y así causar un mayor daño oxidativo al formar con el H_2O_2 el $HO\cdot$. El aumento del Ca^{2+} , al activar las sintasas del óxido nítrico y la oxidasa de NADPH puede propiciar las condiciones para la formación del $ONOO^-$ y con ello para la nitratación de los compuestos celulares. Asimismo el Ca^{2+} activa la polimerasa de ADP-ribosa, que rápidamente puede agotar las pozas de NAD^+ y de ATP celulares. Durante el proceso apoptótico el glutatión se oxida y se pierde. La apoptosis se puede suprimir con antioxidantes como el tocoferol, la N-acetil cisteína, o la sobreexpresión de la catalasa, una peroxirredoxina o una tioredoxina (58). Sin embargo, una vez activadas las caspasas y la endonucleasa cromosomal que fragmenta el ADN, la célula está condenada a la apoptosis.

No todas las alteraciones que ocurren en la célula causadas por el oxígeno y sus derivados se pueden corregir o desechar. Lo imprevisible del sitio en donde se generan una oxidación o reducción de un compuesto celular, el gran número de posibles radicales secundarios que se pueden producir, las diferentes uniones covalentes entre distintos compuestos celulares, la gran variedad de los productos de degradación de los compuestos oxidados y los aductos que pueden generar con otros compuestos celulares, hace que sea imposible desechar todos los compuestos oxidados y algunos, invariablemente, se van acumulando en las células. Un ejemplo de la acumulación de productos oxidados es la lipofuchina que se deposita en los tejidos de los viejos. Es posible que la acumulación de productos oxidados sea la causa del proceso de **envejecimiento**. Está claro que hay mayor cantidad de compuestos oxidados en las células de un animal viejo que en un animal joven (59). Lo que no está claro es cómo estos productos causan los síntomas de la vejez. La sobreexpresión de la CuZnSOD junto con la catalasa en *Drosophila melanogaster* incrementan la longevidad de las moscas un 30%. En cambio, las mutantes de *Drosophila* sin CuZnSOD viven menos que las normales (60). Las mutantes longevas de *Caenorhabditis elegans* tienen un tasa metabólica menor que los nemátodos normales (60). La longevidad tiene que ver con la tasa de consumo del O_2 tanto a nivel de las especies como del individuo, a mayor consumo más rápido se envejece y menor lapso de vida se tiene. Por ello la restricción calórica incrementa la vida hasta en un 30–40% en todas las especies estudiadas.

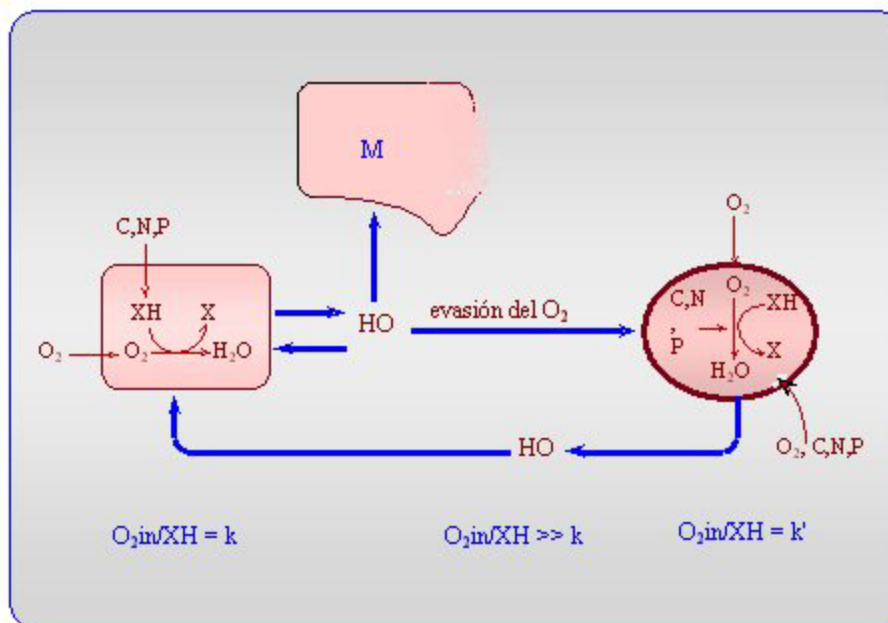


Figura 10. Esquema de la diferenciación celular como respuesta a un estado hiperoxidante. El O_2 entra a la célula por difusión y es reducido casi todo a H_2O , generando energía. Para ello requiere de nutrientes (C,N,P) que junto con la energía se traducen en crecimiento. Mientras se mantenga un equilibrio entre la entrada del O_2 y su reducción (k), el estado de crecimiento es estable. Cuando la célula no puede reducir todo el oxígeno que entra, se genera un estado hiperoxidante inestable (HO), (k aumenta). De este estado la célula puede regresar al estado de crecimiento, si tiene con qué reducir el O_2 , si no, echa a andar mecanismos que evitan o reducen la entrada del O_2 hasta lograr un nuevo equilibrio (k'). En el primer caso la célula se adapta a una condición más oxidante, en el segundo se diferencia. Si no logra ni uno ni otro estado, la célula muere (M). Cuando se rompen las barreras del estado diferenciado y entra el O_2 , se genera un estado hiperoxidante que la célula contrarresta reduciendo el O_2 con los nutrientes que entran junto con el O_2 y así puede regresar al estado de crecimiento. El esquema es una modificación de la figura 1 de la referencia 61.

Las especies de oxígeno reactivas en la diferenciación celular

La tensión oxidativa no sólo regula la proliferación celular, la adaptación a condiciones más oxidantes, la apoptosis y la necrosis de las células sino que tiene un papel fundamental en los procesos de diferenciación celular. Utilizando el ciclo de vida asexual de *N. crassa* para el estudio de la diferenciación celular, hemos observado que, al inicio de cada transición morfogénica, ocurre un estado hiperoxidante en el cual se generan especies de oxígeno reactivas por arriba de la capacidad celular para contender con ellas. Pensamos que la diferenciación celular es una respuesta al estado hiperoxidante y que los mecanismos de diferenciación celular son mecanismos de evasión del oxígeno (61, 62) (Fig. 10). Evidencias del estado hiperoxidante son la

oxidación masiva de proteínas y su degradación (63), la oxidación específica de enzimas con el HO[•] (4, 5, 64), la oxidación de las catalasas por el ¹O₂ (7, 8, 26, 65), la pérdida del poder reductor celular y la excreción del disulfuro de glutación (11, 66), la quimioluminiscencia espontánea dependiente del O₂ y la inhibición de ésta y de la diferenciación celular con antioxidantes (67). Recientemente hemos obtenido una mutante de *N. crassa* sin el gen de la catalasa-3. Tal como esperábamos, esta cepa crece normalmente pero, en condiciones de tensión, tiene una mayor propensión que la cepa silvestre para entrar en el proceso de esporulación y forma seis veces más micelio aéreo y conidios que la cepa silvestre.

Agradecimientos: Agradezco a Teresa Pastor la revisión cuidadosa del texto.

Referencias:

Como sería demasiado extenso dar las citas específicas sobre la información resumida en esta revisión, se recomienda la consulta del libro de Halliwell B y Gutteridge JMC (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3^a edición, Oxford University Press, Oxford, de donde se sacó la mayor parte de la información básica. Asimismo, se buscó dar artículos de revisión o representativos del avance para cada una de las secciones. Para un breve resumen y la metodología relacionada con el campo se recomienda la consulta de los libros de *Methods in Enzymology* editados por Lester Packer, volúmenes 105, 186, 233, 234 y 319.

1. Lledías F y Hansberg W (2000). Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol.* 319:110-119.
2. Marnett LJ y Plataras JP (2001). Endogenous DNA damage and mutation. *Trends in Genetics* 17:214-221.
3. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M y Althaus FR (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol Chem.* 275:40974-40980.
4. Aguirre J y Hansberg W (1986). Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* 166:1040-1045.
5. Aguirre J, Rodríguez R y Hansberg W (1989). Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species. *J. Bacteriol.* 171:6243-6250.
6. Davies MJ y Dean RT (1997). *Radical-mediated protein oxidation*. Oxford University Press, Oxford.
7. Lledías F, Rangel P y Hansberg W (1998). Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 273:10630-10637.
8. Lledías F y Hansberg W. (2000). Oxidation of human catalase by singlet oxygen in myeloid leukemia cells. *Photochem. Photobiol.* 70:887-892.
9. Mullineaux PM y Creissen GP (1997). Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant*

- defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 667-713.
10. Sies H y Ketterer B (1988). Glutathion conjugation. Academic Press, London
 11. Toledo I, Noronha-Dutra AA y Hansberg W (1991). Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 173:3243-3249.
 12. Brigelius-Flohé R y Traber MG (1999). Vitamin E: function and metabolism. FASEB J. 13:1145-1155.
 13. Gralla EB (1997). Superoxide dismutase: studies in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 495-525.
 14. Scandalios JG (1997). Molecular genetics of superoxide dismutase in plants. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp.527-568.
 15. Touati D (1997). Superoxide dismutase in bacteria and pathogen protists. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 447-493.
 16. Okado-Matsumoto A y Fridovich I (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. J. Biol. Chem. 276:38388-38393.
 17. Jin DY y Jeang KT (2000). Peroxiredoxins in cell signaling and HIV infection. En: Antioxidant and redox regulation of genes. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 381-407.
 18. Hoffmann B, Hecht HJ y Flohé L (2002). Peroxiredoxins. Biol. Chem. 383:347-364.
 19. Arnér ES y Holmgren A (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur. J. Biochem. 267:6102-6109.
 20. Brigelius-Flohé R (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radic. Biol. Med. 27:951-965.
 21. Maiorino M y Ursini F (2002). Oxidative stress, spermatogenesis and fertility. Biol. Chem. 383:589-575.
 22. Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW y Behne D (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. FASEB J 15:1236-1238.
 23. Fu LH, Wang XF, Eyal Y, She YM, Donald LJ, Standing KG y Ben-Hayyim G (2002). A selenoprotein in the plant kingdom: Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. 277:25983-25991.
 24. Taurog A (1999). Molecular evolution of thyroid peroxidase. Biochemie 81:557-562.
 25. Smith AT y Veitch NC (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. Curr. Opin. Chem. Biol. 2:269-278.
 26. Asada K (1997). The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 715-735.

27. Peraza L y Hansberg W (2002). *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation. *Biol. Chem.* 383:589-575.
28. Zámocky M, Janecek S y Koller F (2000). Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. *Gene* 256:169-182.
29. Isupov MN, Dalby AR, Brindley AA, Izumi Y, Tanabe T, Murshudov GN y Littlechild, JA (2000). Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*. *J. Mol. Biol.* 299:1035-1049.
30. Díaz A, Rangel P, Montes de Oca Y, Lledías F y Hansberg W (2001). Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Rad. Biol. Med.* 31:1323-1333.
31. Klotz MG, Klassen GR y Loewen PC (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* 14:951-958.
32. Bravo J, Fita I, Gouet P, Jouve HM, Melik-Adamyan W y Murshudov GN (1997). Structure of catalases. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 407-445.
33. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y y Tainer JA (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 296:295-309.
34. Beyer WF Jr y Fridovich I (1985). Pseudocatalase from *Lactobacillus plantarum*: evidence for a homopentameric structure containing two atoms of manganese per subunit. *Biochemistry* 24:6460-6467.
35. Gardner AM y Gardner PR (2002). Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*. Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *J. Biol. Chem.* 277:8166-8171.
36. Babior BM, Benna JE, Chanock SJ y Smith RM (1997). The NADPH oxidase of leukocytes: the respiratory burst oxidase. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 737-783.
37. Gorzalczany Y, Alloul N, Sigal N, Weinbaum C y Pick, E (2002). A Prenylated p67phox-Rac1 Chimera Elicits NADPH-dependent Superoxide Production by Phagocyte Membranes in the Absence of an Activator and of p47phox. *J. Biol. Chem.* 277:18605-18610.
38. Li JM y Shah AM (2002). Intracellular localization and pre-assembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277:19952-19960.
39. Banfi B, Molnár G, Maturana A, Steger K, Hegedûs B, Demaurex N y Krause KH (2001). A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* 276:37594-37601.
40. Torres MA, Dangl JL y Jones JD (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99:517-522.
41. Sagi M y Fluhr R (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 126:1281-1290.

42. Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T y Pai EF (2000). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10723-10728.
43. Colasanti M, Persichini T, Cavalieri E, Fabrizi C, Mariotto S, Menegazzi M, Lauro GM y Suzuki H (1999). Rapid inactivation of NOS-I by lipopolysaccharide plus interferon-gamma- induced tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274:9915-9917.
44. Girón-Calle J y Forman HJ (2000). Cell Ca^{2+} in signal transduction: modulation in oxidative stress. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 105-127.
45. Finkel T (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:248-253.
46. Hassanain HH y Goldschmidt-Clermont PJ (2000). Rac, superoxide, and signal transduction. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 47-79.
47. Klotz LO, Briviba K y Sies, H (2000). Signaling by singlet oxygen in biological systems. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 3-20.
48. Okamoto T, Tetsuka T, Yoshida S y Kawabe T (2000). Redox regulation of NF- κ B. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 203-219.
49. Pineda-Molina E, Klatt P, Vázquez J, Marina A, García de Lacoba M, Pérez-Sala D y Lamas S (2001). Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 40:14134-14142.
50. Toone WM, Morgan BA y Jones N (2001). Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* 20:2336-2346.
51. Choi H, Kim S, Mukhopadhyay P, Cho S, Woo J, Storz G y Ryu S (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105:103-113.
52. Fritz G y Kaina B (1999). Phosphorylation of the DNA repair protein APE/REF-1 by CKII affects redox regulation of AP-1. *Oncogene* 18:1033-1040.
53. Koliward SK, Brezezinska AK y Elliot SJ (2000). Redox regulation of ion channels. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 81-104.
54. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ y Whitelaw ML (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* 295:858-861.
55. Hirota K y Semenza GL (2001). Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 276:21166-21172.
56. Bruick RK y McKnight SL (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294:1337-1340.
57. Jiang X y Wang X (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* 275:31199-31203.
58. Sen ChK (2000). Oxidants and antioxidants in apoptosis: role of Bcl-2. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 221-243.

59. Beckman KB y Ames BN (1997). Oxidants, antioxidants, and aging. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 201-246.
60. Orr WC y Sohal RS (2000). Oxidative stress as a governing factor in physiological aging. En: Antioxidant and redox regulation of genes. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 517-530.
61. Hansberg W y Aguirre J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell insulation from dioxygen. J. Teoret. Biol. 142:201-221.
62. Hansberg W (1996). A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. Ciência e Cultura 48:68-74.
63. Toledo I y Hansberg W (1990). Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. Exp. Mycol. 14:184-189.
64. Toledo I, Aguirre J y Hansberg W (1994). Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. Microbiology 140:2391-2397.
65. Lledías F, Rangel P y Hansberg W (1999). Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. Free Radic. Biol. Med. 26:1396-1404.
66. Toledo I, Rangel P y Hansberg W (1995). Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. Arch. Biochem. Biophys. 319:519-524.
67. Hansberg W, de Groot H y Sies, H. (1994). Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. Free Radic. Biol. Med. 14:287-293.
68. Hansberg W (1999). La biología del dioxígeno en singulete. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, FES Zaragoza, UNAM 2:47-55.



del Arenal Mena IP, Cea Bonilla A, Vázquez Contreras E, Riveros Rosas H (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2002).

(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LA SAGA DEL TRANSPORTADOR DE YODURO (NIS): DE SU IDENTIFICACIÓN MOLECULAR A SU PAPEL CLÍNICO EN EL CÁNCER

Antonio De la Vieja, Orsolya Dohán, Christopher S. Ginter, Viktoriya Paroder, Mia Reed, Claudia Riedel y Nancy Carrasco

Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine,
1300 Morris Park Ave. F-209. Bronx, New York, 10461 USA.

carrasco@aecom.yu.edu

Resumen

El simportador Na^+/I^- (NIS) es una proteína intrínseca de la membrana plasmática que cataliza el transporte activo de I^- en la tiroides, la glándula mamaria lactante, el estómago y las glándulas salivales. La presencia de NIS en la tiroides se utiliza rutinariamente con gran éxito para la visualización diagnóstica de la glándula por cintigrafía y para la terapia del cáncer tiroideo mediante radioisótopos del yodo. Los rápidos avances realizados en la investigación de NIS, enfocados en la determinación del mecanismo de transporte de yoduro dependiente de sodio, ofrecen la posibilidad de aplicaciones médicas de gran alcance, más allá de los padecimientos tiroideos, en áreas tales como el cáncer mamario y cánceres de otros tejidos no tiroideos.

Introducción

El yodo es un componente esencial de las hormonas tiroideas T_3 y T_4 [tri-yodo tironina y tiroxina o (tetra-yodo tironina), respectivamente], que son las únicas hormonas que contienen yodo en vertebrados. Dichas hormonas son los reguladores principales del metabolismo intermedio en prácticamente todos los tejidos, y revisten una importancia fundamental para el desarrollo del sistema nervioso central en el feto y en el recién nacido. Sin embargo, el I^- se encuentra en escasas cantidades en el medio ambiente. En aparente respuesta a ello, en la tiroides ha evolucionado un sistema notablemente eficiente para el transporte de I^- , el cual asegura que la mayoría del I^- que se ingiere en la dieta se acumule en la glándula. Además, existen sistemas comparables de acumulación de I^- en otros tejidos, tales como la glándula mamaria lactante, la mucosa gástrica, y las glándulas salivales (1). Mientras que se desconoce el papel funcional de los sistemas de transporte de I^- en la mucosa gástrica y las glándulas salivales, el sistema de transporte en la glándula mamaria lactante tiene un significado fisiológico claro: cataliza la transferencia de I^- hacia la leche, poniendo de esta manera el anión a disposición del recién nacido lactante, quien puede entonces sintetizar sus propias hormonas tiroideas.

A pesar de la existencia del sistema de transporte de I^- en la tiroides, los trastornos de deficiencia de yodo (IDD) todavía constituyen un serio problema de salud en el mundo, como resultado directo de la ingesta insuficiente de yodo en la dieta (2,3). Las manifestaciones clínicas de los IDD incluyen hipotiroidismo, bocio (crecimiento de la tiroides), enanismo, alteraciones del desarrollo neurológico y cretinismo (la forma más severa de IDD). Se estima que aproximadamente 30% de la población del mundo se encuentra en riesgo de IDD, 750 millones de personas padecen bocio, 43 millones sufren daño cerebral ocasionado por IDD y 5.5 millones padecen cretinismo (2). Dichos gigantescos problemas de salud pública podrían ser solucionados garantizando que toda la sal de mesa que se consume en las zonas afectadas esté yodada, tal y como se ha hecho en muchos países. Sin embargo, las realidades políticas y sociales de las regiones afectadas frecuentemente han impedido la implementación de soluciones de esta naturaleza, lo cual ha representado un enorme costo humano.

El simportador Na^+/I^- (NIS) es una glucoproteína intrínseca de la membrana plasmática que cataliza el transporte activo de I^- en la tiroides, las glándulas salivales, el estómago y la glándula mamaria lactante (4-6). Nuestro grupo aisló una clona de DNA complementario (DNAC) que codifica al NIS de rata (rNIS), una proteína de 618 aminoácidos altamente homóloga con el NIS humano (hNIS, 643 aminoácidos), que fue clonado posteriormente (7). En todos los tejidos donde se expresa, NIS cataliza el transporte activo de I^- mediante el acoplamiento de la translocación de Na^+ hacia el interior de la célula (a favor de su gradiente electroquímico) con la translocación simultánea de I^- , también hacia el interior de la célula (pero en contra de su gradiente electroquímico). Por lo tanto, NIS es un simportador, dado que transporta ambos sustratos (Na^+ y I^-) simultáneamente y en la misma dirección. La fuerza electromotriz del transporte de I^- catalizado por NIS está dada por el gradiente de concentración de Na^+ (gradiente dirigido hacia el interior de la célula) generado por la $ATPase Na^+/K^+$ (8-11). El tiocianato y el perclorato son inhibidores competitivos específicos de la

acumulación de I^- catalizada por NIS (11-13). La hormona estimulante de la tiroides (TSH) estimula la acumulación de I^- en la tiroides (14-15). Como parte del proceso de biosíntesis de las hormonas tiroideas, el I^- acumulado se incorpora a residuos de tirosilo en la molécula de tiroglobulina (Tg), en un fenómeno llamado organificación de I^- (16); la Tg yodada da lugar a T_3 y T_4 (la referencia 16 contiene una descripción detallada de la biosíntesis de las hormonas tiroideas). A diferencia de lo que ocurre en la tiroides, la acumulación de I^- en tejidos extratiroideos no está regulada por TSH (9).

El grado de acumulación de yoduro radioactivo en la tiroides, que se detecta por medio de centelleo, se ha utilizado con gran éxito durante más de 60 años en el diagnóstico y tratamiento de patologías tiroideas (17). No hay duda de que el estudio de NIS, más allá de su inherente interés bioquímico y fisiológico, puede tener también importantes implicaciones para el desarrollo de novedosos tratamientos de cánceres en una amplia variedad de tejidos.

Caracterización molecular de NIS

Utilizando bibliotecas de DNAC derivadas de las células FRTL-5 (una línea altamente funcional de células de tiroides de rata) para expresar NIS en ovocitos de *Xenopus laevis*, aislamos una clona única de DNAC que codifica a NIS (4). Con base en el perfil hidropático y las predicciones de su estructura secundaria, propusimos inicialmente que NIS era una proteína intrínseca de membrana plasmática con 12 segmentos transmembranales y con ambos extremos, amino y carboxilo, orientados hacia el interior de la célula (4). Posteriormente, dicho modelo de 12 segmentos transmembranales ha sido sometido a pruebas experimentales, lo que ha llevado a modificaciones significativas del modelo, como se indica más adelante. Se han identificado en la molécula varios sitios de fosforilación. Se predijo que únicamente tres residuos cargados se localizan dentro de segmentos transmembranales, a saber Asp 16, Glu 79 y Arg 208. La molécula contiene cuatro residuos Leu (en las posiciones 199, 206, 213, 220) que parecen formar un cierre o cremallera de leucinas, el cual podría jugar un papel en la posible oligomerización de subunidades de la proteína en la membrana. La presencia de partículas intramembranales de 9 nanómetros que corresponden a NIS ha sido revelada mediante estudios de microscopía electrónica de criofractura en ovocitos de *X. laevis* que expresan NIS. El tamaño de estas partículas sugiere que NIS podría ser una proteína oligomérica. La glucosilación de NIS ocurre en los residuos Asn 225, 485 y 497. Sin embargo, la glucosilación no es un requerimiento esencial ni para la estabilidad, ni para el tráfico a la membrana plasmática, ni para la función de NIS (18). El modelo actual de estructura secundaria de NIS propone 13 segmentos transmembranales. Además, se ha confirmado por medio de experimentos de inmunofluorescencia que las orientaciones de los extremos amino y carboxilo son extracelular e intracelular, respectivamente (Fig. 1b) (18). A la fecha, cinco segmentos hidrofílicos de NIS (el extremo amino y las asas entre los segmentos transmembranales II y III, VI y VII, VIII y IX, y XII y XIII), de un total de siete, han sido confirmados experimentalmente con orientación externa, como lo predice el modelo actual (Fig. 1b) (19).

El DNAC que codifica a hNIS se identificó con base en la expectativa de que la proteína humana sería altamente homóloga con el NIS de rata. Por medio de cebadores de la secuencia de DNAC de rNIS, Smanik y *col* (7) identificaron una clona de DNAC que codifica a hNIS. La secuencia de nucleótidos de hNIS reveló un marco de lectura abierto de 1929 nucleótidos, codificando una proteína de 643 aminoácidos. hNIS posee 84% de identidad y 93% de similitud con respecto a rNIS. Las principales diferencias entre ambas proteínas son la presencia en hNIS de una inserción de cinco aminoácidos entre los dos últimos segmentos hidrofóbicos, y de otra inserción de 20 aminoácidos en el extremo carboxilo. Posteriormente, Smanik y *col* (20) examinaron la expresión, la organización de exones-intrones y el mapa cromosómico de hNIS. Encontraron 15 exones que codifican hNIS, interrumpidos por 14 intrones, y determinaron que el gene de hNIS se localiza en el cromosoma 19p13 (Fig. 1a).

NIS pertenece a la familia 5A de transportadores de solutos SLC5A (la referencia OMIM de NIS es SLC5A5: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>). Esta familia incluye a la familia de co-transportadores Na⁺-glucosa (SLC5A1), el co-transportador Na⁺-glucosa de baja afinidad (SLC5A2), el transportador Na⁺-mioinositol (SLC5A3), el simportador de prolina dependiente de Na⁺ (SLC5A4), y el transportador de multivitaminas dependiente de Na⁺ (SLC5A6) (21). SLC5A6 posee la homología más alta (42%) (21) con NIS.

El defecto congénito de transporte de yodo (ITD) [OMIM 274400] es un padecimiento autosómico recesivo causado por mutaciones en NIS. En ausencia de moléculas funcionales de NIS, se presenta un marcado descenso en la biosíntesis de hormonas tiroideas, causando hipotiroidismo y altos niveles circulantes de TSH, lo cual a su vez causa bocio (22). A la fecha, se han reportado y diagnosticado a nivel molecular 27 casos de ITD causados por mutaciones en NIS (9). Se han identificado tres mutaciones diferentes que causan proteínas truncadas [C272X, 515X (la cual da por resultado un desplazamiento de seis aminoácidos precediendo a un codón de alto), y Y531X], y seis diferentes mutaciones puntuales que ocasionan sustituciones de aminoácidos (V59E, G93R, Q267E, T354P, G395R, y G543E) (Fig. 1a) (9). Poco después del aislamiento del DNAC que codifica NIS, dos grupos reportaron una mutación puntual homocigótica en pacientes que habían sido diagnosticados previamente como hipotiroideos por ITD congénito (23). Ambos grupos encontraron una sustitución de nucleótido en el exón 9, lo cual da por resultado una Pro en lugar de Thr en la posición 354 (T354P) en NIS. La mutación T354P se localiza en el segmento transmembranal IX de la proteína NIS, de acuerdo con la predicción del modelo (Fig. 1a). Levy y *col* (24) estudiaron la mutación T354P por medio de mutagénesis dirigida y transfección en células COS. Determinaron que T354P NIS no es activo, pero demostraron por análisis de inmunofluorescencia que T354P NIS es trasladado correctamente a la membrana plasmática. También se analizaron otras sustituciones de aminoácidos (Ala, Pro, Cys, Tyr, Ser) en la posición 354 para determinar los requerimientos estructurales del segmento transmembranal IX. Este estudio condujo a la conclusión de que el grupo hidroxilo del carbono β del residuo en la posición 354 es esencial para la función de NIS.

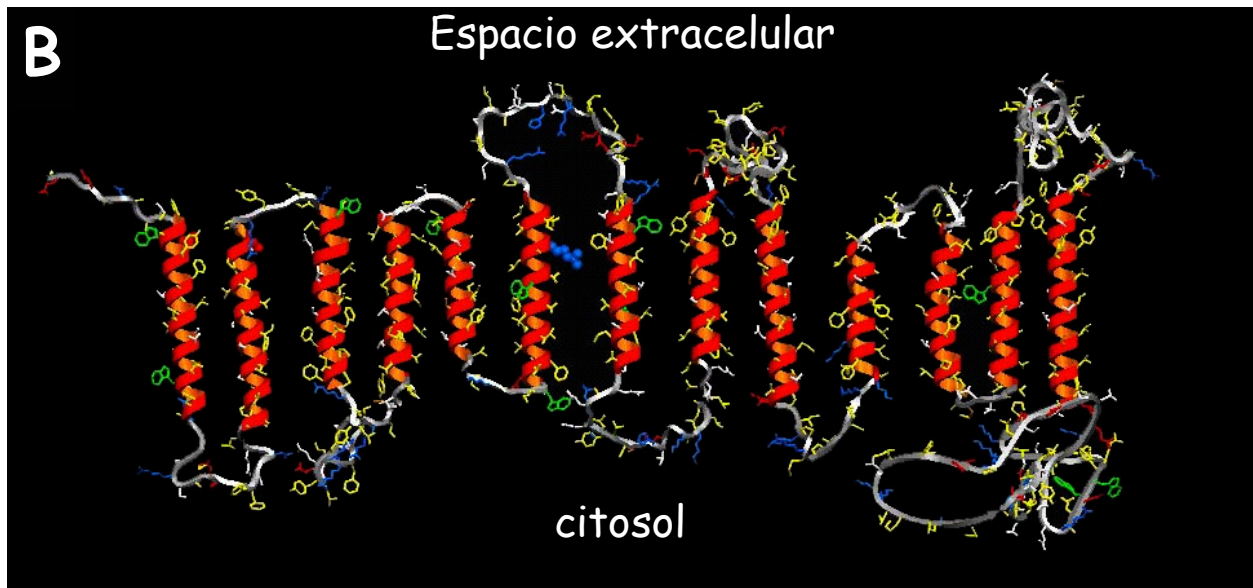
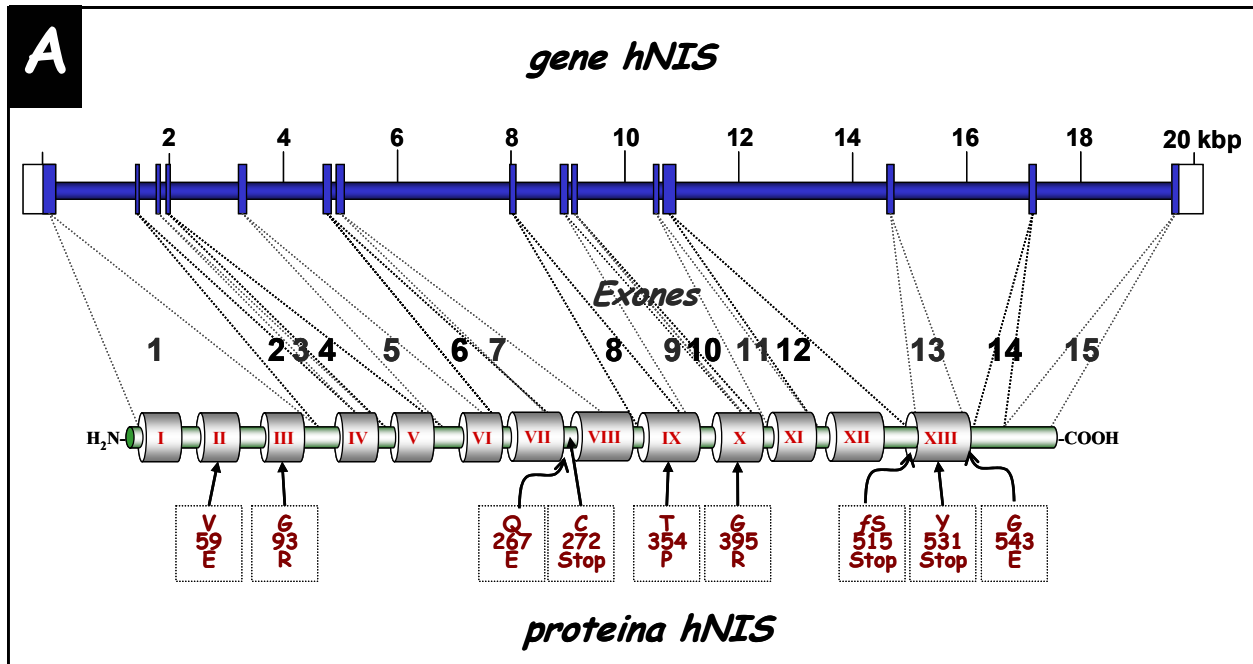


Figura 1. Gene de NIS humano (hNIS) y su correlación con el modelo de estructura secundaria de NIS. **(A)** El gene hNIS se localiza en el cromosoma 19p13 y consiste de 15 exones (cuadrados azules) y 14 intrones. Los exones aparecen conectados con las regiones correspondientes de la proteína mediante líneas punteadas. Los segmentos transmembranales están representados con cilindros. Las localizaciones de las mutaciones que causan defecto del transporte de yodo (ITD) están indicadas con rectángulos verdes. **(B)** Modelo actual de la estructura secundaria de NIS. El extremo NH₂ mira hacia el medio extracelular y el COOH hacia el citósol. Las coordenadas para el modelo se obtuvieron con el programa QUANTA (Molecular Simulations, Burlington, MA, USA). La regularización del modelo se llevó a cabo con el programa 'O'. Las gráficas se generaron con el programa SECTOR. Figuras modificadas de (20, 59).

Es significativo que el segmento transmembranal IX es la hélice con la mayor incidencia de aminoácidos que contienen grupos hidroxilo. De la Vieja y *col* (25) estudiaron el papel que dichos grupos hidroxilo juegan en la función de NIS, mediante la sustitución de los residuos correspondientes con Ala y Pro. Observaron que los grupos hidroxilo de Ser353, Thr354, Ser356 y Thr357 parecen ser esenciales para la actividad de NIS, puesto que NIS solamente fue funcional cuando las mencionadas posiciones estaban ocupadas por Ser o Thr.

Dohán y *col* (26) reportaron recientemente un análisis sistemático de la mutación G395R de NIS, la cual se identificó en pacientes del noroeste de Canadá. No se observó transporte de I^- ni siquiera a concentraciones sobresaturantes del anión, aunque esta proteína (G395R NIS) sí llega a la membrana plasmática. Por medio de sustituciones de varios aminoácidos en la posición 395 se reveló que se requieren cadenas laterales neutras y pequeñas en dicha posición para que NIS sea funcional, indicando que la glicina 395 se encuentra en una región sumamente empaquetada de la proteína. Las sustituciones con aminoácidos con cadenas laterales mayores, como Ala y Ser, produjeron una disminución en la V_{max} sin afectar los valores de K_m para el I^- y el Na^+ , sugiriendo que estos residuos interfieren con la reacción de acoplamiento Na^+/I^- (26).

Eskandari y *col* (13) examinaron el mecanismo, la estequiometría y la especificidad de NIS por medio de métodos electrofisiológicos, métodos de transporte de flujos, y por microscopía electrónica en ovocitos de *X. laevis* que expresan rNIS. Utilizando la técnica de pinza de voltaje con dos microelectrodos (Fig. 2a) y obteniendo registros electrofisiológicos, mostraron que la actividad de NIS es electrogénica; es decir, la adición de I^- al medio provocó la generación de una corriente en estado estacionario de cargas positivas hacia el interior de la célula (Fig. 2b). La medición simultánea de los flujos de los marcadores y de las corrientes reveló que se transportan dos iones Na^+ por cada anión, y demostró claramente una estequiometría de $2Na^+:1I^-$. Además, con base en los resultados cinéticos obtenidos, se propuso un mecanismo de transporte en el que los dos iones de Na^+ se unen a NIS antes que el I^- (es decir, la unión de los iones a NIS es secuencial). Una vez que los tres iones están unidos a la proteína, su translocación al interior de la célula es simultánea. (Fig. 3a).

Además del I^- , una gran variedad de otros aniones generaron corrientes estacionarias similares hacia el interior de la célula (Fig. 3b), indicando que todos estos aniones también se transportan vía NIS. Sin embargo, el perclorato (ClO_4^-), que es el inhibidor más ampliamente caracterizado de la acumulación tiroidea de I^- , no generó corriente alguna, sugiriendo enfáticamente que no se transporta (13). Asimismo, Yoshida y *col* (27) han publicado que el perclorato no indujo una corriente dirigida hacia el interior en células de ovario de hámster chino (CHO) que expresaban NIS de manera estable. La interpretación más factible de estas observaciones es que NIS no transporta al perclorato.

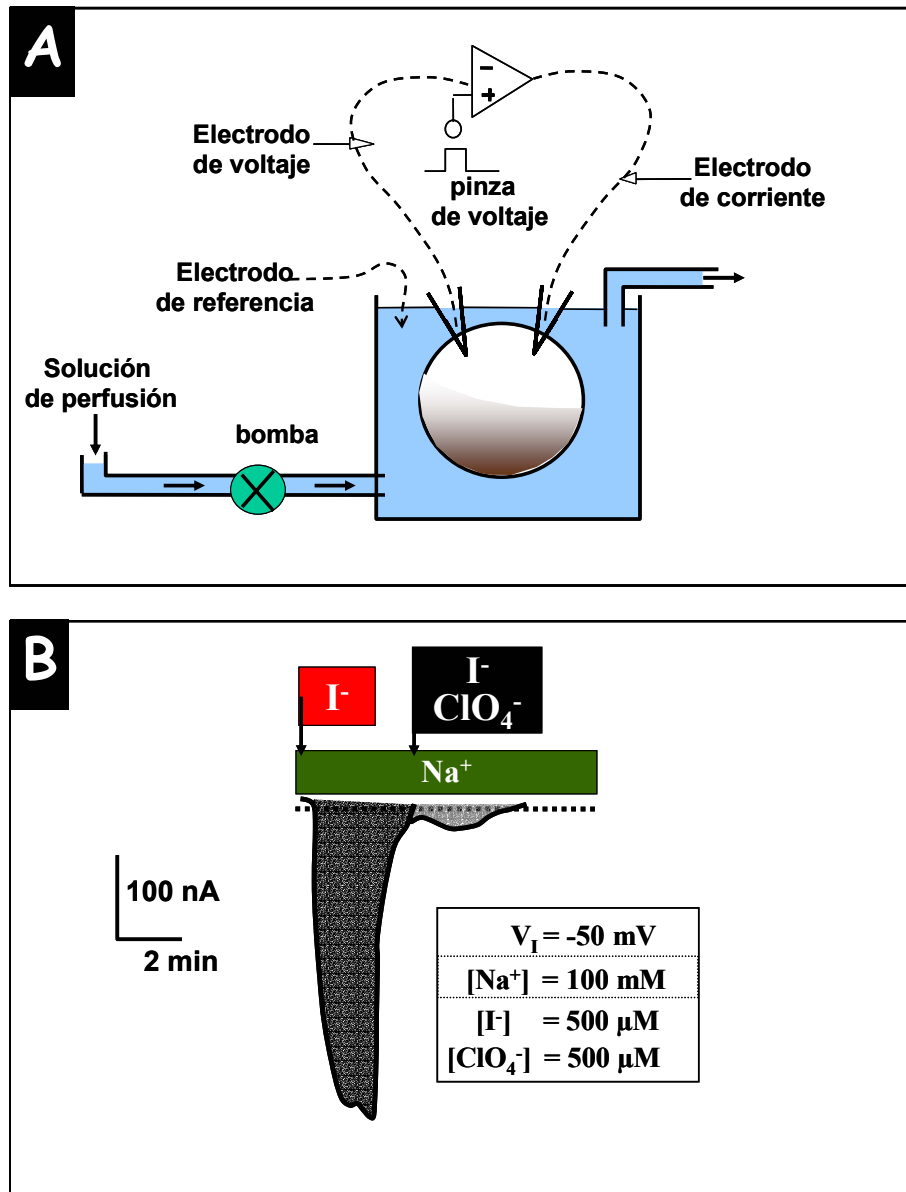


Figura 2. Caracterización electrofisiológica de NIS. **(A)** Esquema del sistema "pinza de voltaje" (voltage clamp) de dos electrodos para registros electrofisiológicos en ovocitos de *X. laevis* que expresan NIS. Los ovocitos de *X. laevis* que expresan NIS se ponen en una cámara y se perfunden continuamente. Dos microelectrodos, uno para mantener el voltaje constante y el otro para registrar los cambios de corriente, se introducen en los ovocitos. **(B)** Electrogenicidad de NIS. La corriente positiva dirigida hacia el interior de la célula es generada por el co-transporte de Na^+ y I^- . La estequiometría es $2Na^+:1I^-$. El perclorato (ClO_4^-) inhibió completamente la corriente causada por el I^- . Figuras modificadas de (59).

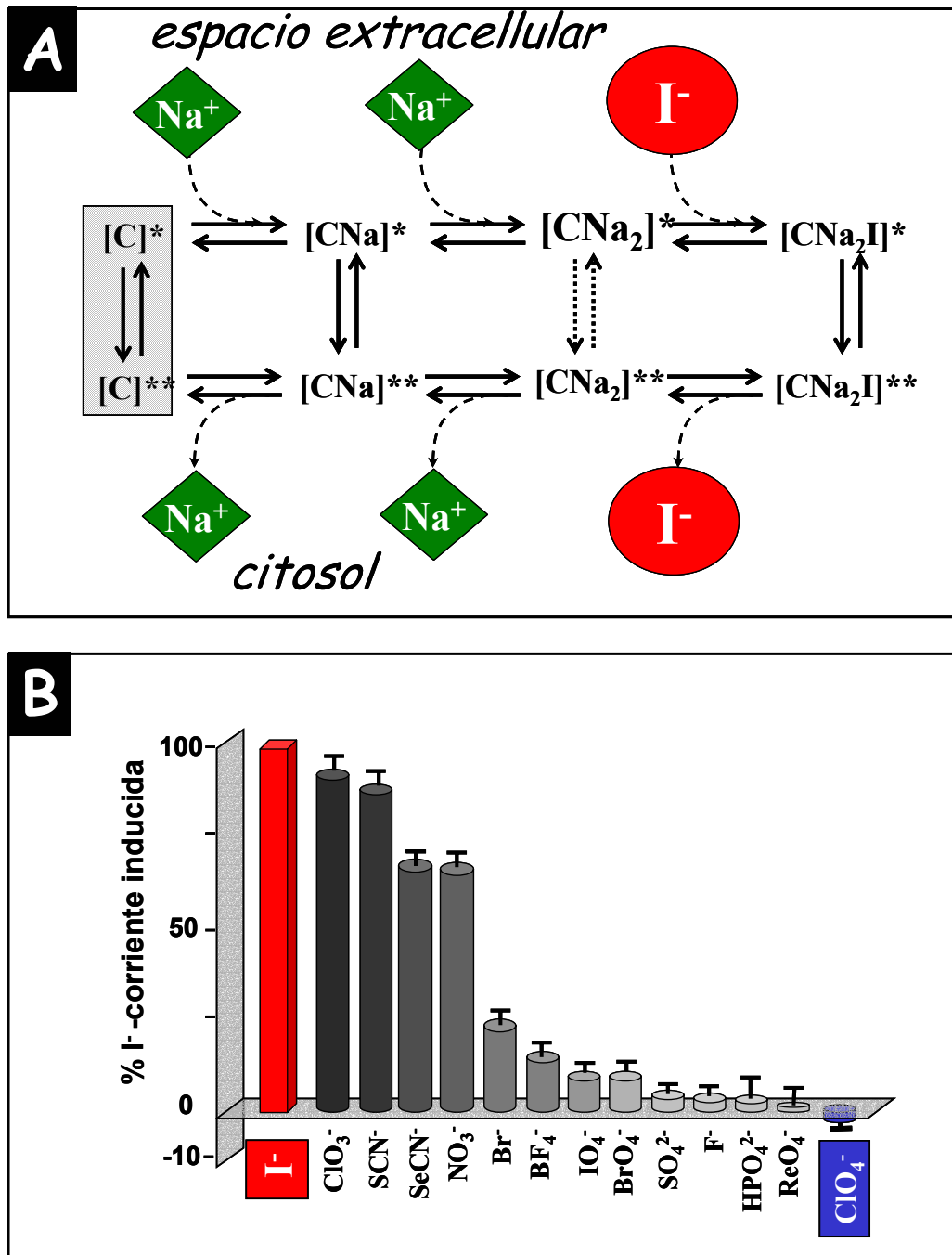


Figura 3. Modelo mecánico y selectividad de NIS. **(A)** Modelo mecánico de NIS en ocho etapas. Los iones de Na⁺ se unen a NIS antes que los de I⁻. El complejo Na⁺-I⁻-NIS experimenta un cambio conformacional para exponer hacia el citosol el Na⁺ y el I⁻ que están unidos a la proteína (citósol). Dichos sustratos se liberan y el acarreador experimenta otro cambio conformacional para exponer al medio externo los sitios vacíos de unión de los sustratos (espacio extracelular). En ausencia de un sustrato aniónico, hay una corriente hacia el interior dependiente de Na⁺ vía NIS (13). **(B)** Selectividad de sustratos en NIS. Las corrientes hacia el interior inducidas por diversos aniones (500 μM) fueron normalizadas con respecto a la corriente generada por I⁻ (cilindro azul oscuro). ClO₄⁻ no generó corriente alguna, sugiriendo que no es translocado. Figuras modificadas de (13, 59).

Expresión fisiológica y regulación de NIS en diferentes tejidos

Durante mucho tiempo se creyó que NIS era una proteína exclusivamente tiroidea. No obstante, actualmente está claro que NIS se expresa en varios tejidos (Fig. 4), en los que NIS se regula de maneras diferentes. Bajo condiciones fisiológicas, la tiroides, las glándulas salivales y el estómago muestran acumulación constitutiva de yodo mediada por NIS. En cambio, NIS en la glándula mamaria se expresa funcionalmente únicamente durante el embarazo tardío y la lactancia (6).

Los DNAs complementarios humanos clonados de mucosa gástrica, glándulas salivales y mamaria (5) son idénticos al del tejido tiroideo. Los análisis inmunohistoquímicos revelaron una tinción de NIS positiva en la membrana basolateral de las células de los conductos salivales (28), las células que secretan mucina en la mucosa gástrica (6,29) y las células epiteliales de la glándula mamaria lactante (6). La localización basolateral polarizada de NIS en todas estas células es marcadamente similar al patrón inmunohistoquímico que se observa en las células foliculares tiroideas (30). El RNAm de NIS ha sido detectado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción reversa del RNAm (RT-PCR), en glándulas salivales, mucosa gástrica, próstata, ovario, testículo, páncreas, placenta, glándula pituitaria y timo (5). Sin embargo, de todos estos tejidos, únicamente las glándulas salivales y la mucosa gástrica presentan acumulación activa de I^- dependiente de Na^+ y sensible a perclorato (1). Por lo tanto, la detección del RNAm de NIS por medio de RT-PCR no puede considerarse evidencia suficiente de la expresión funcional de NIS si es que no está correlacionada con su actividad.

Regulación de la expresión de la proteína NIS en la tiroides

TSH, que es el regulador hormonal principal de la función tiroidea, estimula la acumulación tiroidea de I^- . TSH se sintetiza en la adenohipófisis, y su liberación es estimulada por la hormona liberadora de TSH (TRH) (derivada del hipotálamo) e inhibida por las hormonas tiroideas, a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. La estimulación de la acumulación de yodo por TSH es el resultado, al menos en parte, del aumento en la biosíntesis de NIS dependiente de AMPc (15, 31-33). TSH aumenta la expresión de la proteína NIS *in vivo* (31). La expresión del RNAm de NIS en tiroides de perro se eleva dramáticamente cuando se bloquea la organificación de I^- con propil-tiouracilo (PTU) (34), el cual inhibe principalmente a la peroxidasa tiroidea. A pesar de que se sabe poco acerca de los mecanismos por medio de los cuales TSH regula la actividad de NIS, se ha propuesto que algunos eventos post-transcripcionales podrían jugar un papel importante (35, 36). Las observaciones de que TSH induce la biosíntesis de NIS *de novo* y que modula la larga vida media de NIS, así como que se requiere TSH para el tráfico de NIS hacia la membrana plasmática y/o para su permanencia en la misma, son sumamente interesantes (37). Se ha demostrado también que NIS es una fosfoproteína y que TSH modula su patrón de fosforilación (37). El mapa de fosfopéptidos de NIS obtenido en presencia de TSH resultó marcadamente diferente al que se observó en su ausencia: en presencia de la hormona se resolvieron cinco fosfopéptidos, mientras que en su ausencia únicamente tres (37).

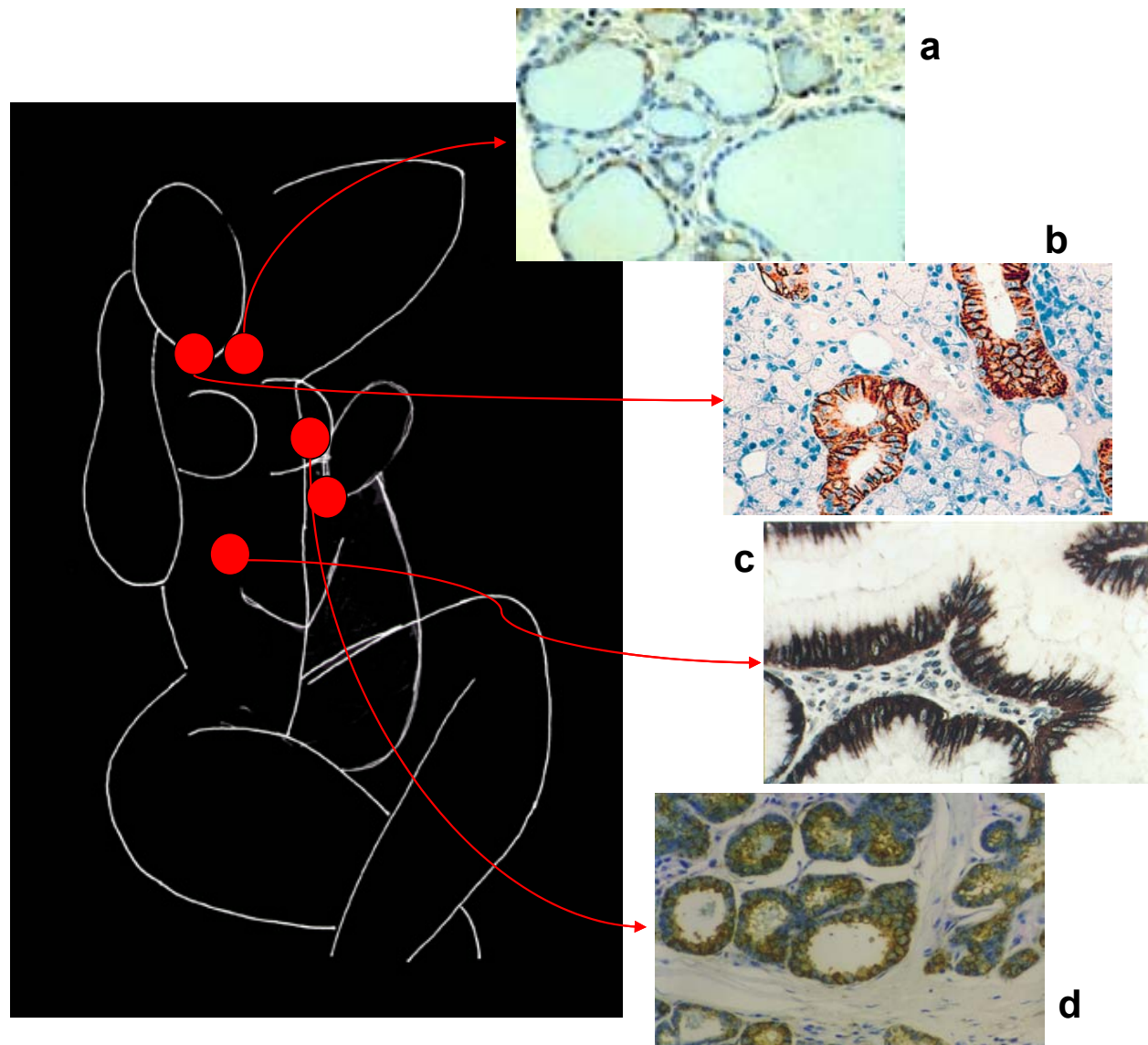


Figura 4. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína NIS en tejidos que exhiben transporte activo de I^- : (a) tiroides, (b) glándula salival, (c) estómago, y (d) glándula mamaria lactante. Los páneles (a), (b) y (d), reproducidos con permiso de (6); panel (c), reproducido con permiso de (59).

Además de TSH, el otro factor regulador principal de la actividad de NIS en la tiroides es el propio I^- . Wolff y Chaikoff reportaron en 1949 que la unión orgánica de I^- en tiroides de rata se bloqueaba cuando el I^- tiroideo alcanzaba un alto umbral crítico, en un fenómeno conocido como el efecto Wolff-Chaikoff agudo (38). Aproximadamente dos días más tarde, en presencia de altas y continuas concentraciones plasmáticas de I^- , se observa un "escape" (o adaptación) del efecto agudo, de manera que el nivel de organificación se restablece y se reanuda la biosíntesis normal de hormonas tiroideas (39). Se ha propuesto que el mecanismo del efecto Wolff-Chaikoff agudo es el resultado

de compuestos yodados orgánicos que actúan como mediadores (40). Se ha sugerido también que el mecanismo del "escape", menos estudiado, obedece a un descenso del transporte de I^- , lo cual lleva a concentraciones intracelulares de I^- suficientemente bajas como para remover la retroalimentación negativa de la inhibición de la organificación de I^- (41). Estudios *in vivo* han mostrado que dosis bajas de I^- inhiben la expresión de los RNAm que codifican a TPO y a NIS en tiroides de perro (34). Posteriormente, Eng y *col* (42) midieron los niveles de RNAm de NIS y de la proteína NIS en respuesta a un exceso, tanto crónico como agudo, de I^- en ratas *in vivo*. Sus resultados mostraron que el descenso en el transporte de I^- observado durante el "escape" es consecuencia de un decremento en la expresión de NIS, lo cual está mediado, al menos en parte, por un mecanismo transcripcional.

Existe evidencia reciente que apoya fuertemente la noción de que la actividad de NIS depende del estado de polarización de la célula (43). TSH estimuló marcadamente los niveles tanto del RNAm como de la proteína NIS en cultivos primarios de tirocitos humanos, tanto en monocapas como en folículos, pero un grado significativo de estimulación de transporte de I^- se observó solamente en los folículos (43). Estas interesantes observaciones indican que, además de la estimulación por TSH, la polarización de las células y la organización espacial son cruciales para la función tiroidea. Entre otros factores que también se han reportado como moduladores de la expresión de NIS se encuentran las citosinas (44), los estrógenos (45) y la tiroglobulina (Tg) (46).

Se han implicado tres factores de transcripción diferentes en la transcripción de genes específicos de la tiroides: factor de transcripción tiroideo (TTF) TTF1, TTF-2 y Pax8 (47). Por lo que se refiere a NIS de rata, Endo y *col* (48) localizaron un sitio de unión para TTF-1 que confiere transcripción específica de tiroides pero sólo ejerce un efecto modesto. El mismo grupo posteriormente identificó un novedoso elemento que responde a TSH (TRE) en la región del promotor de NIS, el cual eleva modestamente la expresión de NIS (49). El efecto de TSH está mediado por AMPc y es específico de la tiroides. La proteína que se une a dicho sitio no es ni TTF-1, ni TTF-2, ni Pax8 ni ningún otro factor de transcripción conocido; la proteína recibió el nombre de NTF-1 (factor 1 de NIS que responde a TSH) (49).

Ohno y *col* reportaron la caracterización completa del amplificador corriente arriba del inicio de la transcripción del gene de rNIS (33). La región reguladora de rNIS contiene un promotor que no es específico de tiroides y un amplificador que reproduce los aspectos más relevantes de la regulación de NIS. El amplificador corriente arriba de NIS (NUE) estimula la transcripción específica en tiroides y es dependiente de AMPc. NUE contiene dos sitios de unión para Pax8, dos sitios de unión para TTF-1 que no tienen efecto en la transcripción de rNIS, y una secuencia degenerada CRE ("cAMP Responsive Element"), la cual es importante para la actividad transcripcional de NUE. En NUE, tanto Pax8 como el todavía no identificado factor de unión similar a CRE (CRE-LBF, o CRE-like binding factor) actúan sinérgicamente para la transcripción de NIS dependiente de TSH y AMPc. Sin embargo, dicho amplificador también tiene la capacidad de mediar la transcripción dependiente de AMPc mediante un novedoso mecanismo independiente de PKA (33) (Fig. 5). La regulación transcripcional del gene

de NIS difiere de las de genes genuinamente restringidos a la tiroides, como los que codifican a Tg y TPO.

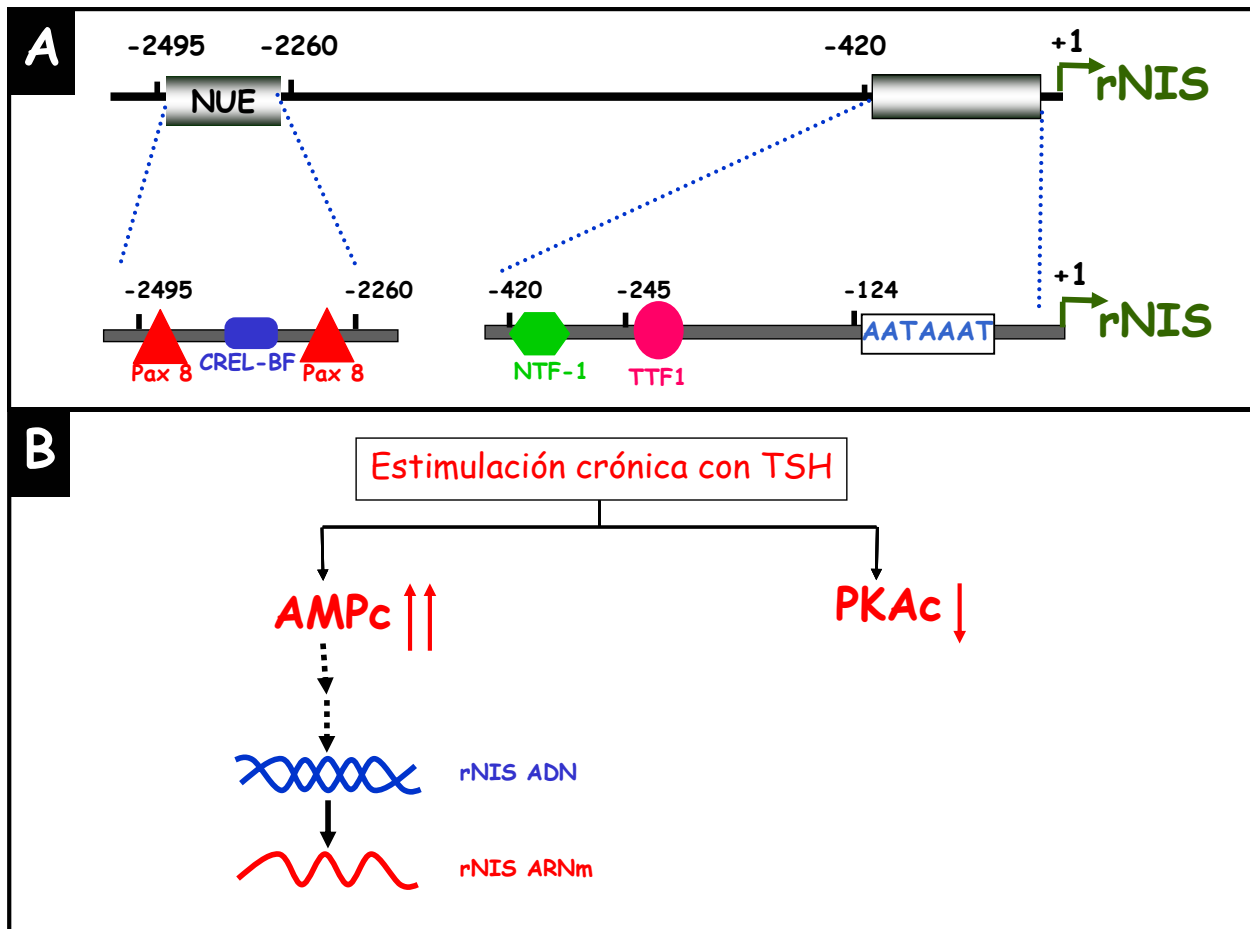


Figura 5. Regulación transcripcional de NIS en células de tiroides de rata. **(A)** Diagrama del promotor de NIS indica el sitio principal de iniciación de la transcripción (+1), la caja TATA (AATAAAT) y el amplificador corriente arriba de NIS (NUE). El sitio NUE contiene dos sitios de unión para Pax8, y una secuencia degenerada CRE ("cAMP responsive element", o secuencia que responde a AMPc), los cuales son importantes para la transcripción completa dependiente de TSH y AMPc. **(B)** regulación de la transcripción del gene NIS en células tiroideas. Durante la estimulación crónica con TSH, AMPc activa la transcripción de NIS (33) aún cuyo la subunidad catalítica de PKA está disminuida. Figura Modificada de (59).

Regulación de la expresión de la proteína NIS en la glándula mamaria

Fisiológicamente, el transporte de I^- en la glándula mamaria tiene lugar en el embarazo tardío y en el curso de la lactancia. El suministro adecuado de I^- para la

debida producción de hormonas tiroideas es esencial para el desarrollo apropiado del sistema nervioso, los músculos esqueléticos y los pulmones del neonato. Tazebay y *col* (6) demostraron que el transporte de I^- en la glándula mamaria está mediado por NIS. Mostraron también que NIS está ausente en glándulas mamarias de ratas núbiles, pero que la detección de la expresión de NIS aumenta a medida que avanza la gestación, y aparece con gran intensidad en glándulas mamarias lactantes. Es interesante que la expresión de NIS se regula, de manera reversible, mediante la succión mamaria durante la lactancia. Estudios *in vivo* realizados en ratones ovariectomizados mostraron que la combinación de β -estradiol, oxitocina y prolactina, en ausencia de progesterona (es decir, los niveles hormonales relativos que prevalecen en ratones durante la lactancia), conducen a los niveles más altos de expresión de NIS (6).

Impacto patofisiológico de NIS

Impacto de NIS en el cáncer tiroideo

La actividad de NIS juega un papel central en el diagnóstico y la terapia del carcinoma tiroideo diferenciado. En el análisis de centelleo, la mayoría de los cánceres tiroideos exhiben un menor grado de acumulación de I^- comparado con el tejido circundante. Sin embargo, se requiere una suficiente actividad de transporte de I^- en las células cancerosas tiroideas para que la terapia de radioablación con ^{131}I sea efectiva contra células tiroideas malignas residuales o metástasis, después de llevar a cabo una tiroidectomía (17). La ablación con yodo radioactivo destruye tanto carcinomas tiroideos microscópicos ocultos como tejido tiroideo normal residual, lo cual permite realizar estudios de centelleo de todo el cuerpo para detectar la presencia de carcinomas persistentes (ver más adelante). Dada la disminución en el transporte de I^- que se observa en la mayoría de los cánceres tiroideos, durante mucho tiempo existió la suposición de que la expresión de NIS estaría disminuida en células tiroideas cancerosas. Mas aún, varios investigadores se han enfocado en encontrar maneras de inducir la transcripción de NIS en cáncer tiroideo, buscando mejorar la capacidad de las células tiroideas cancerosas para transportar I^- y, de esa manera, aumentar la efectividad de la terapia con yodo radioactivo (50, 51). Sin embargo, varios reportes recientes empleando diversos métodos han revelado un cuadro más complejo. Sorprendentemente, algunos cánceres tiroideos sobreexpresan NIS (52-54). Los datos más recientes sugieren que la disminución del transporte de I^- observada en el cáncer tiroideo diferenciado podría ser el resultado de alteraciones en el transporte de NIS hacia o su permanencia en la membrana plasmática. Un discernimiento más completo de la regulación de NIS en la tiroides sana y cancerosa podría proporcionar ideas para llevar a cabo mejorías de las estrategias terapéuticas con yodo radioactivo en casos de carcinoma tiroideo.

Impacto de NIS en el cáncer mamario

La capacidad de las células tiroideas cancerosas para transportar I^- activamente vía NIS, aún en los casos en los que sólo una fracción de NIS llega a la membrana

plasmática, ofrece un sistema único y efectivo para detectarlas y destruirlas con dosis terapéuticas de yodo radioactivo, esencialmente sin dañar otros tejidos. Por lo tanto, parece ser factible que el yodo radioactivo podría ser una herramienta diagnóstica y terapéutica para la detección y destrucción de otros cánceres en los que NIS esté expresado funcionalmente. Apuntando en esta dirección, un reporte reciente de Tazebay y col (6) mostró que tanto carcinomas mamarios humanos como carcinomas mamarios experimentales en ratones transgénicos expresan NIS. Imágenes de centelleo obtenidas *in vivo* en adenocarcinomas mamarios experimentales en ratones transgénicos no grávidos y no lactantes, portadores del oncogene *ras* activado o sobreexpresando el oncogene *neu*, demostraron una actividad pronunciada de NIS, específica y susceptible de inhibición con perclorato (6). Por lo tanto, los autores concluyeron que los ratones transgénicos, portadores de tumores mamarios experimentales, ofrecen un modelo excelente para estudiar el papel potencial de NIS en el cáncer mamario, particularmente en lo que se refiere a la efectividad de la terapia con yodo radioactivo para combatir esta enfermedad. Por medio de análisis inmunohistoquímicos, Tazebay y col (6) también mostraron que el 87% de los 23 cánceres humanos invasivos y el 83% de los 6 carcinomas de los conductos *in situ* expresaron NIS, a diferencia de solamente el 23% de las 13 muestras extratumorales tomadas de la zona circundante a los tumores. Aún más significativo fue el hallazgo de que ninguna de las ocho muestras normales tomadas de mamoplastías reductivas estudiadas expresaron NIS. Estos resultados sugieren que el yodo radioactivo podría representar una modalidad terapéutica novedosa contra el cáncer mamario.

Terapia genética basada en NIS

Se han publicado varios experimentos *in vitro* relacionados con terapia genética basada en NIS, con propósitos tanto diagnósticos como terapéuticos, en los que se utilizó el transporte de yodo radioactivo vía NIS para visualizar y destruir células tumorales malignas. Células tumorales (de melanoma y de carcinomas de ovario, hígado y colon) transducidas con rNIS exhibieron actividad de transporte de I⁻ (55). Experimentos *in vitro* mostraron que dichas células transducidas eran susceptibles de ser destruidas mediante la acumulación de ¹³¹I. También ha sido posible inducir *in vivo* en células cancerosas de próstata la actividad de transporte de I⁻, con especificidad de tejido (prostático) y dependencia de andrógenos, por medio de expresión de NIS dirigida por el promotor del antígeno específico de la próstata (PSA) (56). En otro estudio en xenotransplantes de una línea celular de próstata humana que expresa NIS, establecidos en ratones inmunosuprimidos, se observó acumulación activa en los tumores de 20 a 30% del I⁻ administrado *in vivo* (57). Notablemente, la dimensión de los de los tumores de los xenotransplantes se redujo significativamente después de una sola inyección intraperitoneal de una dosis terapéutica (3 mCi) de ¹³¹I.

La estrategia de terapia genética es, sin duda, uno de los desarrollos mas prometedores en lo que se refiere a los posibles usos de la caracterización molecular de NIS en el diagnóstico y tratamiento del cáncer en una amplia variedad de tejidos.

Comentarios finales

En el curso de apenas unos cuantos años, nuestra concepción de NIS ha evolucionado de proteína específica de la tiroides, altamente significativa en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades tiroideas, pero desconocida a nivel molecular, a un transportador extensamente caracterizado mas allá de la tiroides. NIS posee aplicaciones médicas potencialmente de largo alcance en el cáncer mamario y el cáncer en otros tejidos. Dichas aplicaciones, al igual que otros conceptos relevantes para la bioquímica de los transportadores de membrana, son algunos de los logros que podrían alcanzarse en el futuro cercano a medida que continúen los avances encaminados hacia purificar y reconstituir NIS como una proteína activa, elucidar las relaciones estructura-función de la molécula de NIS, y descubrir los mecanismos involucrados en la regulación diferencial de la expresión de NIS en diversos tejidos.

Referencias.

1. Brown-Grant K (1961) Extra thyroidal iodide concentrating mechanisms. *Physiol Rev* 41: 189-213
2. WHO, UNICEFF y ICCIDD (1993) Global prevalence of iodide deficiency disorders in micronutrient deficiency. Geneva, Information System WHO, UNICEFF y ICCIDD.
3. Delange F (1994) The disorders induced by iodine deficiency. *Thyroid* 4:107-128
4. Dai G, Levy O y Carrasco N (1996) Cloning y characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379: 458-460.
5. Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, y Heufelder AE (1998) Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues y cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1746-1751.
6. Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zhao QH, Deng HF, Amenta PS, Fineberg S, Pestell RG, y Carrasco N (2000) The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation y in breast cancer. *Nat Med* 6: 871-878.
7. Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, y Jhiang SM (1996) Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 339-345.
8. Bagchi N y Fawcett DM (1973) Role of sodium ion in active transport of iodide by cultured thyroid cells. *Biochim Biophys Acta* 318: 235-251.
9. De la Vieja A, Dohan O, Levy O, y Carrasco N (2000) Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid y extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev* 80: 1083-1105.
10. Weiss SJ, Philp NJ, y Grollman EF (1984) Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology* 114: 1090-1098.
11. Carrasco N (1993) Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta* 1154: 65-82.
12. Nagataki S y Yokohyama N (1996) Other Factors Regulating Thyroid Function. Autoregulation: Effects of Iodide. En: *The Thyroid*. Braverman, L.E.&U.R.D. ed. Lippincott-Raven, Philadelphia. pp. 241-247.

13. Eskyari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, y Carrasco N (1997) Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem* 272: 27230-27238.
14. Vassart G y Dumont JE (1992) The thyrotropin receptor y the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* 13: 596-611.
15. Weiss SJ, Philip NJ, Ambesi-Impiombato FS, y Grollman EF (1984) Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate y dependent on protein synthesis. *Endocrinology* 114: 1099-1107.
16. Taurog AM (2000) Thyroid Hormone Synthesis. En: *The Thyroid a Fundamental and Clinical Text*. Braverman, L.E.&U.R.D. ed. Lippincott, Philadelphia. pp. 75-79.
17. Mazzaferri EL (2000) Carcinoma of the Follicular Epithelium. En: *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. Braverman, L.E.&U.R.D. ed. Lippincott, Philadelphia. pp. 904-930.
18. Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, y Carrasco N (1998) N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem* 273: 22657-22663.
19. De la Vieja A, Ginter, CS y Carrasco N (2000) Topology of the sodium-iodide symporter. *Endocr J* 47 (Suppl.): 162.
20. Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL, y Jhiang SM (1997) Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* 138: 3555-3558.
21. Turk E y Wright EM (1997) Membrane topology motif in the SGLT cotransporter family. *J Membr Biol* 159: 1-20.
22. Wolff J (1983) Congenital goiter with defective iodide transport. *Endocr Rev* 4: 240-254.
23. Fujiwara H, Tatsumi K, Miki K, Harada T, Miyai K, Takai S, y Amino N (1997) Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻ symporter *Nat Genet* 16: 124-125.
24. Levy O, Ginter CS, De la Vieja A, Levy D, y Carrasco N (1998) Identification of a structural requirement for thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS) function from analysis of a mutation that causes human congenital hypothyroidism. *FEBS Lett* 429: 36-40.
25. De la Vieja A, Ginter CS y Carrasco N (2000) Several hydroxyl-containing amino acid residues in transmembrane segment IX are important for sodium/iodide symport activity. *Endocr J* 47 (Suppl.): 162.
26. Dohán O, Gavrielides V, Ginter CS, Amzel LM y Carrasco N (2002) A small y uncharged amino acid residue at position 395 is required for Na⁺/I⁻ symporter (NIS) activity. *Mol Endocrinol (en prensa)*
27. Yoshida A, Sasaki N, Mori A, Taniguchi S, Mitani Y, Ueta Y, Hattori K, Sato R, Hisatome I, Mori T, Shigemasa C, y Kosugi S (1997) Different electrophysiological character of I⁻, ClO₄⁻, y SCN⁻ in the transport by Na⁺/I⁻ symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 731-734.
28. Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, DeYoung BR, Smanik PA, Mcgauchy VR, Fischer AH, y Mazzaferri E (1998) An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues y salivary gland tissues. *Endocrinology* 139: 4416-4419.
29. Vayre L, Sabourin JC, Caillou B, Ducreux M, Schlumberger M, y Bidart JM. (1999) Immunohistochemical analysis of Na⁺/I⁻ symporter distribution in human extra-thyroidal tissues. *Eur J Endocrinol* 141: 382-386.

30. Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, y Bidart, JM (1998) Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4102-4106.
31. Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, y Carrasco N (1997) Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5568-5573.
32. Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A., Kawaguchi A, y Onaya T (1997) Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression y protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 138: 2227-2232.
33. Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, y Di Lauro R (1999) The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene y participates in both thyroid-specific y cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 19: 2051-2060.
34. Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE, y Miot F (1997) Moderate doses of iodide *in vivo* inhibit cell proliferation y the expression of thyroperoxidase y Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 131: 195-203.
35. Kaminsky SM, Levy O, Salvador C, Dai G, y Carrasco N (1994) Na⁺-I⁻ symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I⁻-transporting cultured thyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3789-3793.
36. Paire A, Bernier-Valentin F, Selmi-Ruby S, y Rousset B (1997) Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship between its expression y activity. *J Biol Chem* 272: 18245-18249.
37. Riedel C, Levy O y Carrasco N (2001) Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter (NIS) by thyrotropin. *J Biol Chem* 276: 21458-21463.
38. Wolff J y Chaikoff IL (1948) Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem* 174: 555-560.
39. Wolff J, Chaikoff IL, Goldberg RC, y Meier JR (1948) The temporary nature of the inhibitory action of excess iodide on organic synthesis in the normal thyroid. *Endocrinology* 45: 504-513.
40. Dugrillon A (1996) Iodolactone y iodoaldehyde: mediator of iodide in thyroid autoregulation. *Exp. Clin Endocrinol Diabetes* 104(Suppl. 4): 41-45.
41. Braverman LE y Ingbar SH (1963) Changes in thyroidal function during adaptation to large doses of iodide. *J Clin Invest* 42: 1216-1231.
42. Eng PHK, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, y Braverman LE (1999) Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid y protein. *Endocrinology* 140: 3404-3410.
43. Kogai T, Curcio F, Hyman S, Cornford EM, Brent GA, y Hershman JM (2000) Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium/iodide symporter messenger RNA y protein expression. *J Endocrinol* 167: 125-135.
44. Ajjan RA, Watson PF, Findlay C, Metcalfe RA, Crisp M, Ludgate M, y Weetman AP (1998) The sodium iodide symporter gene y its regulation by cytokines found in autoimmunity. *J Endocrinol* 158: 351-358.

45. Furlanetto TW, Nguyen LQ, y Jameson JL (1999) Estradiol increases proliferation y down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 140: 5705-5711.
46. Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ullianich L, y Kohn LD (1999) Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake by suppressing expression of the sodium/iodide symporter gene. *Endocrinology* 140: 5422-5430.
47. Missero C, Cobellis G, De Felice M, y Di Lauro R (1998) Molecular events involved in differentiation of thyroid follicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 140: 37-43.
48. Endo T, Kaneshige M, Nakazato M, Ohmori M, Harri N, y Onaya T (1997) Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na⁺/I⁻ symporter gene. *Mol Endocrinol* 11: 1747-1755.
49. Ohmori M, Endo T, Harri N, y Onaya T (1998) A novel thyroid transcription factor is essential for thyrotropin-induced up-regulation of Na⁺/I⁻ symporter gene expression. *Mol Endocrinol* 12: 727-736.
50. Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, y Ain KB (1999) Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻ symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2449-2457.
51. Schmutzler C y Kohrle J (2000) Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid* 10: 393-406.
52. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, Muramatsu A, y Onaya T (1998). Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 101: 1296-1300.
53. Arturi F, Russo D, Giuffrida D, Schlumberger M, y Filetti S (2000) Sodium-iodide symporter (NIS) gene expression in lymph-node metastases of papillary thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol*. 143: 623-627.
54. Dohán O, Baloch Z, Banrevi Z, Livolsi V y Carrasco N (2001) Predominant Intracellular Overexpression of the Na⁺/I⁻ Symporter (NIS) in a Large Sampling of Thyroid Cancer Cases. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2697-2700.
55. Myell RB, Myell LZ, y Link CJ Jr. (1999) Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene. *Cancer Res* 59: 661-668.
56. Spitzweg C, Zhang S, Bergert ER, Castro MR, McIver B, Heufelder AE, Tindall DJ, Young CY, y Morris JC (1999) Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 59:2136-2141
57. Spitzweg C, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, y Morris JC (2000) Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter. *Cancer Res* 60: 6526-6530.
58. Armstrong R, Wen W, Meinkoth J, Taylor S, y Montminy M (1995) A refractory effect in cyclic AMP-responsive transcription requires down-regulation of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 15: 1826-1832.
59. Riedel C, Dohán O, De la Vieja A, Ginter CS y Carrasco N (2001) Journey of the iodide transporter NIS: from its molecular identification to its clinical role in cancer. *Trends Biochem Sci* 26: 490-496.



Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2002).

(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

ENFERMEDADES RELACIONADAS AL PLEGAMIENTO ANÓMALO DE LAS PROTEÍNAS.

^{1,2}María Elena Chánez-Cárdenas, ¹David Alejandro Cisneros Armas, ³Luis del Pozo Yauner, ³Baltazar Becerril y ¹D. Alejandro Fernández-Velasco*

¹Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas,
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

²Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Insurgentes sur 3877, Col. La Fama, 14269.

³Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura. Instituto de Biotecnología,
UNAM.

* fdaniel@servidor.unam.mx

Introducción

La vida es un gran teatro molecular en donde las proteínas desempeñan papeles protagónicos en prácticamente todas las funciones celulares. Para poder "ser", cada "ser humano" utiliza aproximadamente 30,000 tipos de proteínas; cada una de ellas lleva a cabo una función específica.

La clasificación más general de las proteínas las divide en dos grupos: fibrosas y globulares. Las proteínas **fibrosas** muestran en su estructura la repetición de elementos de estructura secundaria, como hélices o hebras β , para formar fibras cilíndricas alargadas que son utilizadas como sostén estructural de células y tejidos.

Por otra parte, las proteínas **globulares** contienen, además de las hélices y hebras, estructuras no repetitivas como asas y giros, gracias a las cuales adoptan estructuras compactas y globulares con una función particular. Las proteínas globulares tienen la capacidad de reconocer a otras moléculas, tan pequeñas como el O₂ o tan grandes como ellas mismas. El reconocimiento molecular es específico, ya que se da mediante la complementariedad de superficies. Debido a esto, cada proteína es capaz de reconocer a una entre las miles de moléculas que encuentra en su camino. El reconocimiento molecular es esencial para todas las funciones celulares, como acelerar la velocidad de las transformaciones químicas, transmitir información, transportar moléculas y regular su flujo e incluso reconocer moléculas propias de las extrañas. Esta multitud de funciones es posible gracias a la estructura tridimensional de las proteínas.

Las proteínas adquieren su estructura tridimensional en un proceso llamado plegamiento, en el cual, cada secuencia particular adopta la conformación nativa o de mínima energía. El plegamiento a la conformación nativa es un proceso central para que las proteínas puedan llevar a cabo su función correctamente. Por tal razón, la célula cuenta con mecanismos para evitar y revertir el plegamiento incorrecto de las proteínas; sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que un gran número de patologías están relacionadas con conformaciones anómalas de estas moléculas. En estos casos, proteínas cuya conformación nativa es globular, adoptan una estructura fibrosa. Estas patologías pueden tener un origen genético, esporádico o infeccioso.

A la fecha no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares que le han permitido a una proteína, a lo largo de la evolución, permanecer soluble en las condiciones particulares del organismo, o formar agregados insolubles que se depositan en órganos y tejidos causando una patología. Sin embargo, en el fondo todas estas patologías se derivan de una aberración conformacional. Es por esto, que en adelante nos referiremos a ellas como “enfermedades del plegamiento anómalo de las proteínas” (EPAPs).

Las enfermedades del plegamiento anómalo de proteínas (EPAPs).

El plegamiento incorrecto de las proteínas afecta las funciones celulares a diferentes niveles. Para algunas enfermedades como la fibrosis quística y el enfisema pulmonar familiar, existe una clara relación entre un error en el plegamiento y una disfunción celular. La proteína afectada no se secreta en la cantidad adecuada, o bien, no lleva a cabo su función correctamente (1).

Por otra parte, existe un gran número de patologías, reunidas bajo el nombre general de **amiloidosis**, en las que los errores de plegamiento conllevan a la formación irreversible de agregados fibrilares insolubles llamados **amiloides**. Dentro de este grupo se encuentran enfermedades diversas, como las enfermedades de Alzheimer y Creutzfeldt-Jakob, la diabetes tipo II, y la encefalopatía espongiiforme bovina (Ver Tabla 1). Actualmente, no se sabe con certeza si la presencia de fibras amiloides en estas patologías, es causa o efecto de la disfunción celular. De hecho, las causas de la formación de estas fibras también son tema de debate.

TABLA 1. Enfermedades del plegamiento anómalo de las proteínas.

| ENFERMEDAD O SÍNDROME | PRECURSOR | DISTRIBUCIÓN |
|---|---------------------------------|-------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> Enf. de Alzheimer: esporádica, familiar o de inicio temprano⁶ | Proteína precursora A β | Localizada |
| <ul style="list-style-type: none"> Encefalopatías espongiformes: Kurú, Encefalopatía espongiforme Bovina (síndrome de las vacas locas), <i>Scrapie</i> (ovejas) y Síndrome de Creutzfeldt-Jakob (humanos). | Proteína príon (PrP) | Localizada |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis AL primaria y asociada a mieloma | Cadena ligera de Igs | Sistémica, Localizada |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis AH primaria o asociada a mieloma | Cadena pesada de Igs | Sistémica, Localizada |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis familiar senil sistémica³ | Transtiretina | Sistémica, ¿Localizada? |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis AA | Apoproteína AA sérica | Sistémica |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis AH debida a hemodiálisis crónica | Microglobulina β_2 | Sistémica, ¿Localizada? |
| <ul style="list-style-type: none"> Polineuropatía familiar amiloidótica, tipo IV y Amiloidosis Hereditaria Renal. | Apolipoproteína AI | Sistémica, Localizada |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis Familiar⁴ | Gelsolina | Sistémica |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis Sistémica hereditaria | Variantes de Lisozima | Sistémica |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis Familiar | Cadena α del Fibrinógeno | Sistémica |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis Sistémica hereditaria⁵ | Cistatina C | Sistémica |
| <ul style="list-style-type: none"> Tumor de células C de la tiroides | (Pro) calcitonina | Localizada |
| <ul style="list-style-type: none"> Insulinomas de los Islotes de Langerhans (Diabetes Mellitus Tipo II) | Polipéptido insular amiloide | Localizada |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis en aurículas | Factor natriurético atrial | Localizada |
| <ul style="list-style-type: none"> Prolactinomas de la Glándula pituitaria asociados al envejecimiento | Prolactina | |
| <ul style="list-style-type: none"> Amiloidosis iatrogénica | Insulina | Localizada |

(³) Prototipos portugués, japonés y sueco. (⁴) Prototipo finlandés. (⁵) Prototipo islandés.

(⁶) Prototipo holandés.

Las amiloidosis están relacionadas con anomalías en la estructura de las proteínas, cuya causa puede ser hereditaria o adquirida. Se caracterizan por el depósito extracelular amiloide, en órganos como cerebro, bazo, riñón e hígado, de proteínas precursoras particulares, o sus fragmentos. La acumulación de los agregados amiloides es irreversible y se asocia con la disfunción del (los) órgano(s) afectado(s). Los pacientes mueren en un período de tiempo variable posterior a la aparición de los síntomas, algunas de estas enfermedades tienen un impacto especialmente importante en grupos de edad avanzada.

Varias proteínas han sido definitivamente identificadas como precursores de amiloides asociados a patologías específicas (Tabla 1), aunque es de esperar que muchas otras se vayan sumando con el tiempo. La enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington no han sido consideradas por muchos grupos como amiloidosis ya que el depósito de la proteína precursora es intracelular y aparentemente los depósitos no poseen las características típicas del amiloide. Sin embargo, se pueden considerar EPAPs. Los aspectos clínicos y moleculares de las amiloidosis y la amiloideogénesis son actualmente campos muy activos de investigación debido al gran impacto que tienen estas enfermedades.

¿Qué son los amiloides?

El uso del término **amiloide** en este grupo de enfermedades se debe al patólogo alemán R. Virchow (2), quien lo usó para referirse a ciertos depósitos hallados en muestras *post-mortem* de órganos y tejidos. Estos depósitos reaccionan con el yodo, por lo que supuso se debían a la acumulación de sustancias del tipo del almidón. Después de un siglo se sigue utilizando este término, aunque actualmente se sabe que el constituyente fundamental de estos agregados es de naturaleza proteica, y no glucosídica. No obstante, compuestos de este tipo, particularmente los glucosaminoglucanos, están generalmente presentes en los depósitos y son responsables de la reacción positiva al yodo.

Independientemente de la proteína involucrada o de las manifestaciones clínicas de la enfermedad producida, los agregados amiloides poseen en común las siguientes características fundamentales:

1. Aspecto blanquecino y homogéneo, se tiñen con eosina.
2. Se tiñen con Rojo Congo en medio alcalino, y muestran birrefringencia verde manzana al ser observados en el microscopio de luz polarizada (3).
3. Poseen estructura fibrilar cuando se observan con microscopio electrónico (4).
4. Muestran un patrón de difracción de rayos X de tipo hebra β cruzado (5).
5. Son afines a los colorantes Tioflavín T y Tioflavín S, con los que forman complejos fluorescentes (6).

Otros componentes proteicos no fibrilares asociados a los agregados amiloides son: los proteoglicanos del tipo de heparán sulfato, glucosaminoglucanos, el componente "P" del amiloide y la apolipoproteína E. En algunos casos menos

frecuentes se pueden encontrar ubiquitina, fibronectina, vitronectina, iones metálicos como Ca^{2+} y algunos componentes del complemento como C1q y C4-BP (7).

Estudios detallados al microscopio electrónico de amiloides *ex vivo* y sintéticos han mostrado, en todos los casos analizados, que el diámetro de las fibras es de alrededor de 10 nm (100 Å) y están formadas por unidades llamadas protofilamentos. El número de éstos últimos varía dependiendo del tipo de amiloide, pero comúnmente es entre 3 y 6 y se encuentran orientados paralelamente al eje longitudinal de la fibrilla. En un corte transversal, las fibras amiloides se observan como un cilindro hueco (7-9).

Los amiloides más estudiados son los que están asociados a patologías, no obstante, varias proteínas que aparentemente no están relacionadas con una patología específica, como el módulo SH3 de la cinasa P13 (1) y la mioglobina (10), tienden a agregarse. De hecho, bajo condiciones adecuadas, un gran número de proteínas sin homología forman amiloides, lo cual sugiere que este fenómeno puede ser común a todas las proteínas.

El plegamiento de las proteínas y el origen de la agregación.

El plegamiento de las proteínas es el proceso por el cual la secuencia de aminoácidos adopta una estructura tridimensional que constituye su forma nativa. En algunas proteínas, además del estado nativo y el desplegado, existen estados parcialmente plegados conocidos como intermediarios (esquema 1 al final del texto). La concentración de proteínas en el citoplasma es elevada. A pesar de ello, las proteínas en el estado nativo normalmente no se agregan. Por otra parte, el estado desnaturalizado tiene una vida media muy corta. En este sentido, diversas evidencias sugieren fuertemente que la agregación se debe a la asociación específica de estados no nativos (esquema 1).

Varias enfermedades que presentan depósitos de proteínas agregadas, se han asociado a factores genéticos. Es decir, mutaciones puntuales en la proteína provocan su agregación. ¿De qué manera las mutaciones facilitan la agregación? En términos físicoquímicos, las mutaciones pueden alterar la estabilidad o la velocidad de interconversión entre la forma nativa y la forma fibrilar (esquema 2 al final del texto).

Se han encontrado condiciones desnaturalizantes (ver esquema 1) que favorecen la presencia de conformaciones no nativas, que actúan como precursores de la formación de las fibras amiloides (11, 12). Un caso particular, es la estabilización de un conformero parcialmente plegado de la α -sinucleína, la cual está involucrada en la enfermedad de Parkinson, la demencia asociada a cuerpos de Lewy y la variante de la enfermedad de Alzheimer también asociada a cuerpos de Lewy (12). Como se mencionó anteriormente, un gran número de proteínas sin homología, o bien no asociadas a enfermedades, forman amiloides bajo las condiciones adecuadas. Si es así, ¿Porqué no se agregan todas las proteínas?

Mecanismos celulares para evitar la agregación.

Debido a que las células cuentan con mecanismos para evitar y revertir el plegamiento anómalo de las proteínas, se ha propuesto que las EPAPs se deben, al menos parcialmente, a: 1) Alteración de los mecanismos que regulan las condiciones fisiológicas; 2) Fallas en el "control de calidad" postraduccional.

Dentro del primer caso, se ha propuesto que el pH ácido afecta tanto la translocación de las proteínas en los endosomas, como la degradación de éstas en los lisosomas (1). Se ha sugerido también que el ambiente de los endosomas propicia la formación de enlaces disulfuro interproteicos, los cuales pueden favorecer los estados fibrilares (13). En el caso de enfermedades asociadas a la proteína PrP, se ha propuesto que el aumento en el depósito de priones involucra tanto un cambio conformacional, como una reacción de intercambio tiol/disulfuro entre el polímero PrP^{Sc} y el disulfuro del monómero PrP^C (14). Por otra parte, se han encontrado condiciones *in vitro* que favorecen la formación de fibrillas ricas en estructura β plegada, tanto en la proteína PrP (13,15) como en la acilfosfatasa (11), ambas sometidas a pH ácido.

Para el caso de las fallas en el control postraduccional, se ha estudiado la respuesta a estrés en el retículo endoplásmico (RE) y el control de calidad del plegamiento de las proteínas. El estrés en el RE es provocado por la ruptura de las condiciones normales del proceso postraduccional como la inhibición de la glucosilación y la reducción de enlaces disulfuros entre otros. Esto causa la acumulación de proteínas en conformación no nativa en el RE y que la célula responda incrementando la transcripción de genes de chaperonas e isomerasas de disulfuros para replegar correctamente a las proteínas. Si la respuesta al estrés en el RE no es adecuada, las proteínas se agregan formando amiloides (16).

El control de calidad del plegamiento de las proteínas, está constituido de manera paralela por chaperonas y proteasas. Las primeras tienen la función de plegar o replegar correctamente a las proteínas recién sintetizadas, y las segundas la de degradar a aquellas proteínas que aún con la acción de las chaperonas no se pliegan correctamente. Cuando los mecanismos de control fallan, las proteínas dañadas se acumulan causando enfermedades amiloidogénicas. Aún no se sabe si este control falla por mutaciones en las chaperonas y/o proteasas, porque los precursores de las proteínas priogénicas (ver más adelante) y amiloidogénicas tienen estructuras que no son reconocidas por estas enzimas, o bien, porque la agregación es mucho más rápida que el reconocimiento de chaperonas y proteasas (17).

Priones

En las enfermedades infecciosas, tradicionalmente pensamos en el "ente infeccioso" como un organismo o ser vivo, o bien, una organización macromolecular compleja compuesta al menos por ácidos nucleicos y proteínas, como en el caso de los virus. Es por esto sorprendente el concepto de la "proteína infecciosa", esto es, una proteína plegada en una conformación alterada capaz de ejercer coerción sobre las

proteínas normales para que éstas adopten una conformación “maligna”. Esta idea ha rondado en varias líneas de investigación a través de los años. (18).

¿Poseen las proteínas la habilidad de transferir información heredable? El concepto de la proteína infecciosa, está íntimamente ligado al término **prion**. Un prion es una proteína codificada por el cromosoma que presenta una conformación alterada. Los priones han perdido su función original, pero han adquirido la habilidad de convertir a las moléculas de proteína normales en priones (19, 20). Este fenómeno fue descrito originalmente en proteínas de mamíferos, tales como el “scrapie” en ovejas, la encefalopatía espongiforme bovina (enfermedad de las vacas locas) y la enfermedad de Creutzfeld-Jakob en humanos. Estas enfermedades se asocian a cambios en la proteína PrP (Fig. 1) (21).

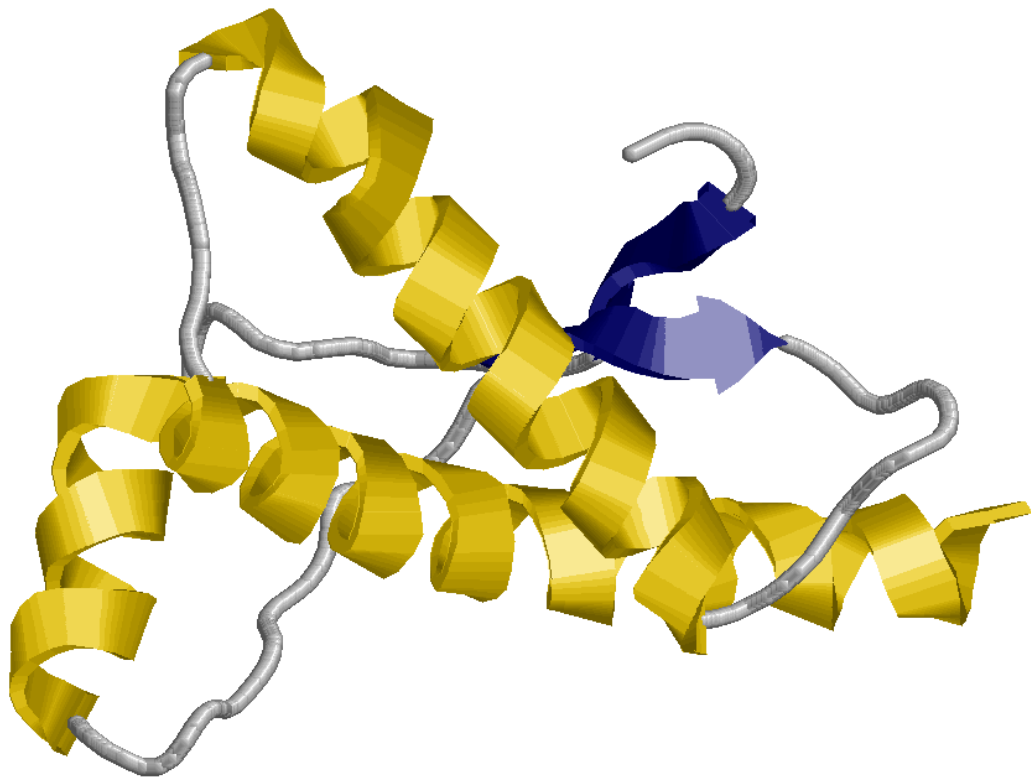


Figura 1. Estructura cristalográfica de la proteína PrP^C humana, residuos 23-230. Generada en RasMol a partir del archivo 1QLZ del Protein Data Bank.

El descubrimiento de un fenómeno semejante en representantes del reino fungi: la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Podospora anserina*, un hongo filamentoso, ha facilitado el estudio genético de este fenómeno y ha mostrado que la presencia de conformaciones anómalas de las proteínas es un evento más común de lo que pensamos.

En la levadura *S. cerevisiae* se han detectado al menos dos elementos hereditarios no cromosomales (proteicos), [URE3] (Figura 2) y [PSI] (20). Ambos elementos se generan de manera espontánea y pueden transmitirse de manera “no mendeliana” durante el apareamiento. [URE3] y [PSI] son las formas prónicas de los genes *Ure2p* y *Sup35* respectivamente. Se han propuesto tres criterios genéticos para diferenciar entre los fenotipos originados por priones de aquellos debidos a ácidos nucleicos (20):

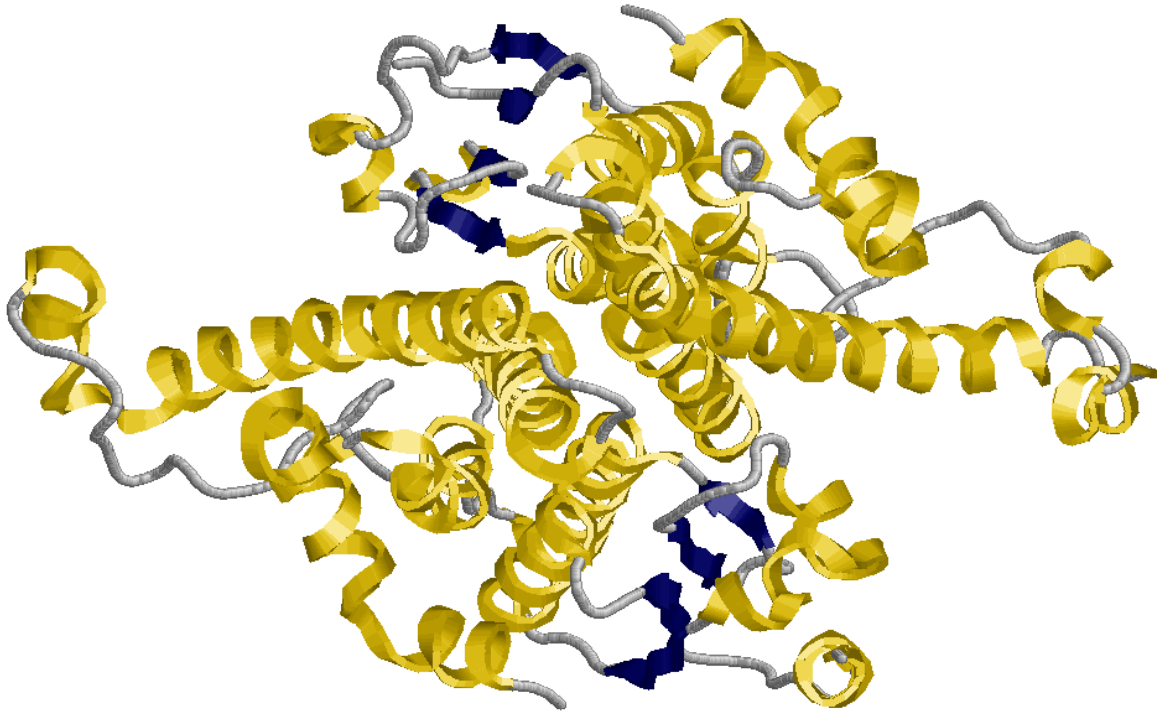


Figura 2. Estructura cristalográfica de la proteína prionica de levadura [URE2]. Generada en RasMol a partir del archivo 1G6Y de Protein Data Bank.

1) Curación reversible. El evento inicial que da lugar al prion es un cambio conformacional, este evento es probabilístico. La presencia de priones (fenotipo) puede curarse al crecer a las células en 1-5 mM de cloruro de guanidinio (GdnHCl), este compuesto es utilizado rutinariamente como desnaturizante de proteínas. La enfermedad reaparece en estas cepas (sin la introducción de DNA) con la misma frecuencia que la encontrada en las cepas silvestres (10^{-6}). La curación es reversible ya que la generación de los priones es probabilística.

2) La sobreproducción de la proteína normal aumenta la frecuencia de aparición de los priones. Ya que la formación inicial de los priones es un cambio espontáneo en la proteína, se espera que al sobreproducirla, el aumento en la población aumente la probabilidad de aparición del fenómeno. La sobreproducción de Ure2p aumenta de 20 a 200 veces la frecuencia de generación de [URE3] *de novo*.

3) La relación entre el fenotipo priónico y mutaciones en el gen que codifica para la proteína. Ya que el fenotipo priónico se propaga gracias a la presencia de la proteína (normal o mutada), aquellas mutaciones que prevengan su síntesis, también prevendrán la propagación del prion. Esto es, el gen cromosomal es necesario para la propagación de este elemento genético no mendeliano (20).

Otros factores asociados a la formación de amiloides

Si bien no se han establecido en detalle los mecanismos moleculares responsables de la agregación amiloide, sí se conocen un conjunto de factores que están relacionados, de una u otra forma, al comportamiento anormal de las proteínas implicadas en estas enfermedades. Mediante estudios genéticos se han identificado mutaciones que generan proteínas amiloidogénicas. En la mayoría de estos casos, la enfermedad producida es heredada como un carácter autosómico dominante, y es de inicio temprano. En cambio, otros tipos de amiloidosis son de ocurrencia aparentemente esporádica, y su inicio es a edad avanzada. En estas variantes se ha demostrado que, usualmente, la proteína precursora posee una secuencia silvestre, lo que sugiere que factores del ambiente molecular del individuo pudieran ejercer una acción importante en la amiloidogénesis (7).

Mecanismos asociados a la formación de los agregados amiloides.

Una característica general observada en el fenómeno de la agregación amiloide, es la transformación irreversible de proteínas de estructura variada a una conformación compuesta principalmente por hebras β . Esta transformación estructural no se observa en algunas enfermedades relacionadas con la agregación de proteínas, como la anemia falciforme. Esta enfermedad es causada por una mutación puntual en la superficie de la hemoglobina S, que no modifica significativamente la estructura secundaria de la proteína, la agregación es debida a cambios en la hidrofobicidad de la superficie, por lo tanto, las fibrillas formadas están constituidas por proteínas que mantienen la estructura nativa, (22).

Cuando el producto final es un agregado rico en hojas β (nX), esta especie puede originarse a partir de la proteína nativa o de un intermediario de plegamiento (Figuras 3 y 4). El origen de nX puede ser una proteína monomérica u oligomérica

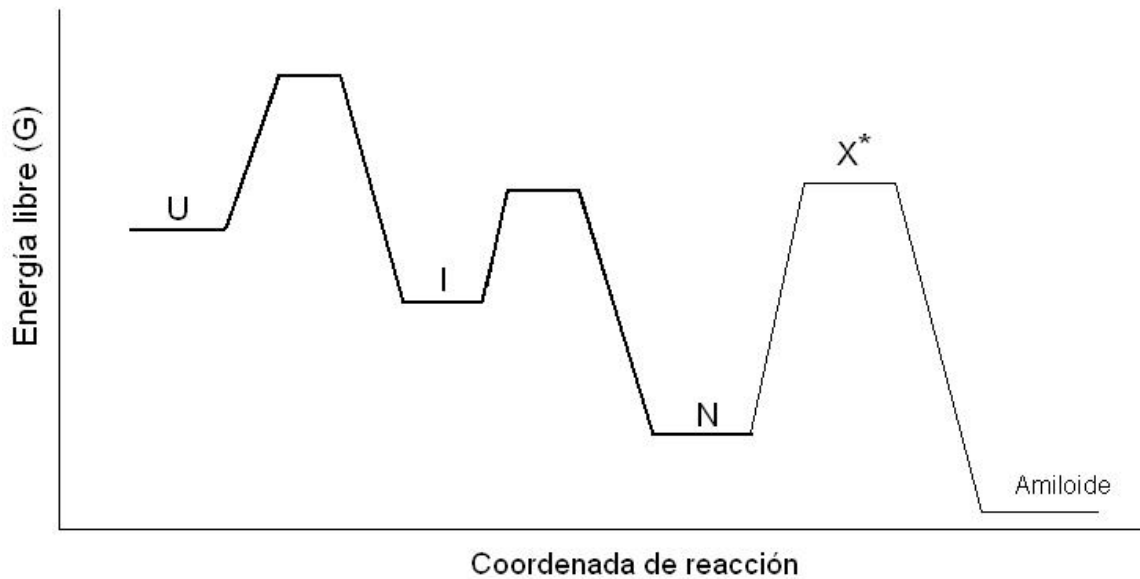


Figura 3. La conformación nativa de la proteína puede ser la especie amilodogénica. (U) estructura desnaturalizada, (I) estructura parcialmente plegada, (N) estructura nativa, (X*) especie indefinida.

En este momento el reto es conocer los mecanismos que desencadenan la formación de las fibrillas, para contestar preguntas tales como si la modificación conformacional es anterior o ulterior a la agregación.

Los agregados se forman a partir de la estructura nativa (N), en equilibrio con una especie indefinida (X*) propensa a agregarse (Figura 3). La barrera de activación entre estas especies puede ser muy grande, por lo que la reacción puede estar parcialmente bajo control cinético, alternativamente, se ha propuesto que la formación de X* presenta un comportamiento determinístico, esto es, dominado por la heterogeneidad de las moléculas (23).

Si las fibras se derivan de un intermediario de la ruta de plegamiento, el agregado amiloide es una trampa cinética en el camino de la proteína desnaturalizada (U) a N (Figura 4). Se han caracterizado intermediarios de varias proteínas, que presentan exposición de zonas hidrofóbicas (11-13) que pueden actuar como centros de nucleación para la formación de los agregados.

Por otra parte, la aparición espontánea de agregados sugiere la posibilidad de agregación *in vivo* de proteínas silvestres. Mutaciones en genes susceptibles, facilitarían la formación de amiloides. (ver esquema 2).

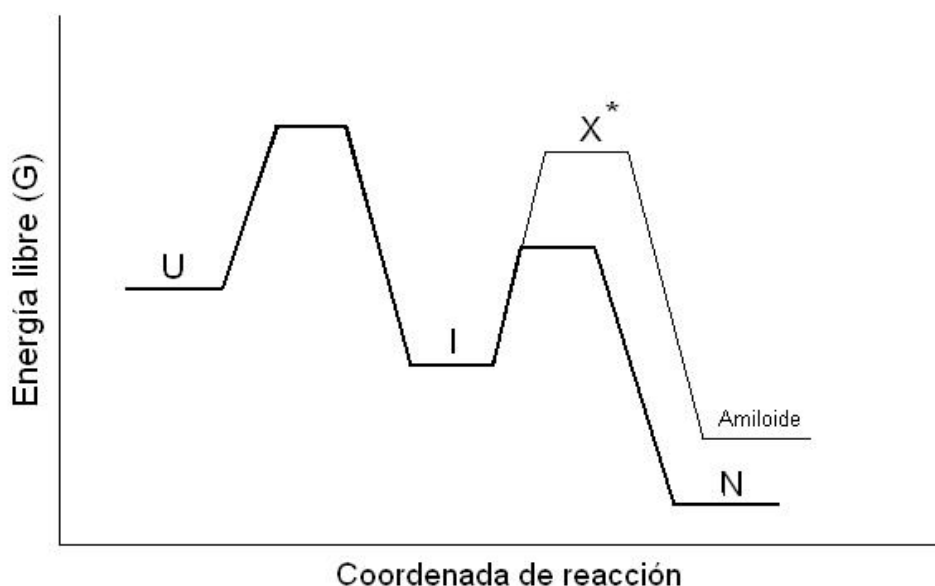


Figura 4. La formación de amiloides como trampa cinética en la ruta de plegamiento de una proteína. (abreviaturas iguales a la Fig. 3).

Descripción breve de algunas amiloidosis.

I. Enfermedad de Alzheimer.

Esta enfermedad degenerativa del Sistema Nervioso Central puede afectar a más del 40% de las personas mayores de 85 años (24). Se caracteriza, entre otras alteraciones, por el depósito de placas de amiloide compuestas por agregados de péptidos derivados de la proteína precursora del amiloide β (PPA β). Esta proteína es una glicoproteína integral de membrana, que es codificada por un gen constituido por 19 exones, situado en el cromosoma 21. Aunque su función no es bien conocida, se piensa que es importante en el desarrollo neuronal. Se conocen varias isoformas de la PPA β , que resultan del procesamiento alternativo de su RNA mensajero (25). Luego de su síntesis en el retículo endoplásmico, la proteína es secretada, momento en el que puede ser procesada proteolíticamente por enzimas denominadas genéricamente “secretasas”, que cortan su extremo amino terminal. La γ secretasa genera péptidos de entre 39 y 43 residuos, algunos de los cuales desempeñan un papel fundamental en la formación de los depósitos de amiloide causantes de la enfermedad (26). Los péptidos amiloides β (A β) que comprenden las posiciones 1-40 y 1-42 son los de mayor importancia. El A β ₁₋₄₂ es el más amiloidogénico, tanto *in vivo* como *in vitro*, y constituye la mayor parte de los agregados de las placas amiloides.

La secuencia de aminoácidos de los péptidos amiloidogénicos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ es a siguiente:

$A\beta_{1-40}$ DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
 $A\beta_{1-42}$ DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

La enfermedad de Alzheimer se presenta en dos formas, la más frecuente es la forma esporádica, que afecta fundamentalmente a individuos de edad avanzada. La otra es la forma familiar de inicio temprano, cuya herencia es autosómica dominante, y representa aproximadamente entre el 5-10% de todos los casos. Al igual que otras amiloidosis, en la forma familiar de inicio temprano de la enfermedad, se han identificado mutaciones que afectan a la PPA β (27). Adicionalmente se han identificado mutaciones en dos genes que codifican para las presenilinas 1 y 2, las que parecen intervenir en el control del procesamiento de la PPA β por la γ secretasa (28). Las formas mutadas de las presenilinas pudieran, por alguna vía no bien conocida, promover el incremento de la concentración local de los péptidos amiloidogénicos que resultan del procesamiento de la PPA β . Las mutaciones en el gen de la PPA β y de las presenilinas explican sólo alrededor de la mitad de los casos de la forma familiar de la enfermedad. Otros genes deben estar implicados, los cuales pudieran también participar en la producción, procesamiento y catabolismo de PPA β .

II. Amiloidosis por transtiretina.

Transtiretina. Esta proteína sérica, muy conservada en las especies hasta ahora estudiadas, antes denominada pre-albúmina, posee en su estructura cuaternaria cuatro subunidades idénticas de 127 residuos de aminoácidos y 13,745 Daltones (Da) (29). La estructura tridimensional de cada monómero de transtiretina se compone de ocho hebras β (A-H) organizadas en dos hojas β plegadas anti-paralelas que se asocian en una estructura tipo “sándwich”, y un sector corto de hélice α que conecta las hebras E y F (Figura 5) (30). En el humano esta proteína es codificada por un gen único localizado en el cromosoma 18 (31). La función de la transtiretina se relaciona con el transporte de la hormona tiroxina y de la proteína que une retinol (RBP del inglés “retinol binding protein”). Para ambos ligandos la transtiretina posee sitios de unión diferentes (32).

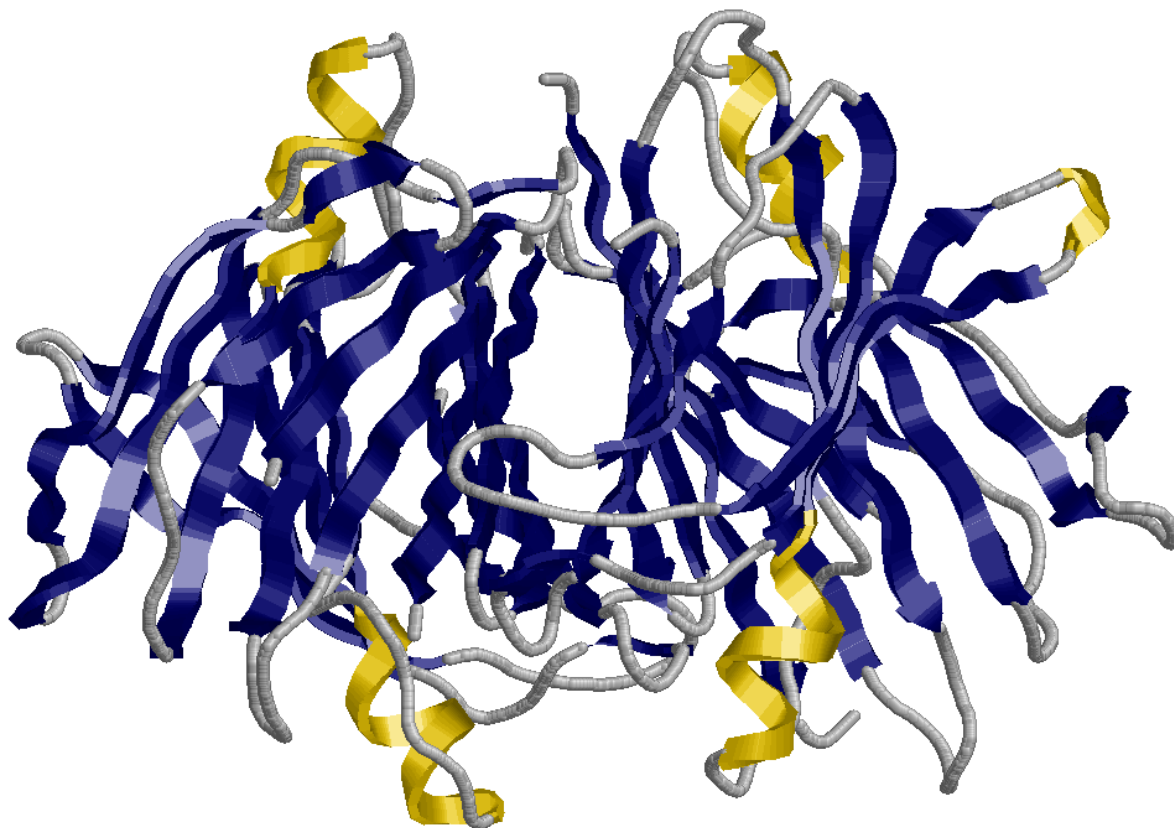


Figura 5. Estructura cristalográfica de la mutante altamente amiloidogénica de transtiretina G53S/E54D/L55S. Generada en RasMol a partir del archivo 1G1O del Protein Data Bank.

Polineuropatía familiar amiloide. Esta amiloidosis, como su nombre lo especifica, es hereditaria, de inicio temprano, y tiene su origen molecular en mutaciones puntuales en la secuencia de la transtiretina. Hasta el momento, se han reportado 78 sustituciones de aminoácidos que ocurren en 51 sitios diferentes. Todas, excepto seis, son amiloidogénicas (33). Si bien las mutaciones se distribuyen a todo lo largo de la secuencia, las modificaciones en el asa que comprende los residuos 51-56, y que conecta las hebras C y D, son altamente amiloidogénicas (34). La primera variante identificada fue la mutación Val30Met, que se encontró en familias del norte de Portugal. Estos pacientes eran afectados por un trastorno autosómico dominante caracterizado por neuropatía sensoriomotora periférica y autosómica (35). Posteriormente se identificó la misma causa para casos similares reportados en Suecia, Japón y los EEUU (36). A partir de entonces, se han reportado mutaciones en otras regiones de la misma proteína en varias familias que sufren polineuropatía amiloidótica, y otras en las que el órgano fundamentalmente afectado es el corazón (cardiomiopatía amiloidótica familiar). También puede presentarse afectación renal, y en el caso de la variante Val30Met, es de tipo familiar (7). Aunque la penetrancia de los genes mutados que causan la enfermedad es alta en muchas familias, se han identificado diferencias entre

comunidades, lo cual sugiere que factores ambientales o del fondo genético de cada grupo de individuos, pueden ser importantes. Los suecos que portan la variante Val30Met muestran una menor penetrancia del gen y un inicio más tardío de la enfermedad que los portugueses que portan igual variante. Muy interesante es el reporte de dos hermanos gemelos monocigóticos suecos de edad media, uno solo de los cuales padece la enfermedad.

Amiloidosis senil sistémica. En esta enfermedad, cuyo inicio es tardío, el amiloide es formado, en su mayor parte, por un fragmento de transtiretina cuyo extremo amino terminal se encuentra entre los residuos equivalentes a las posiciones 46-52 de la secuencia silvestre, y por tanto, carece de tres de las 8 hebras β . También la molécula completa, con secuencia normal, forma parte de los depósitos (7, 37).

Cardiomiopatía familiar amiloidótica de inicio tardío. En esta forma de amiloidosis se han reportado tanto casos en los que la proteína precursora posee la secuencia normal, como otros en los que se presenta la mutación Val122Ile. Esta mutación ocurre en el 4% de los individuos de origen afro-americano, y parece conferir, después de los 60 años, un riesgo muy importante para la acumulación de amiloide en el corazón (7,37).

III. Amiloidosis por proteína sérica amiloide A (Amiloidosis AA).

La proteína sérica amiloide A (SAA): El humano posee tres isoformas de esta proteína (SAA1, SAA2 y SAA3) codificadas por tres genes (*saa1*, *saa2* y *saa4*) situados en el cromosoma 11. Para cada isoforma se han reportado variantes alélicas que están determinadas por sustituciones en las posiciones 52, 57 y 60 (38). La concentración sérica de la proteína SAA, cuya masa molecular es 12,500 Da, se incrementa apreciablemente durante la fase aguda de la respuesta inflamatoria, y su función parece estar relacionada con la regulación del metabolismo de lipoproteínas durante la inflamación.

La amiloidosis AA es causada por la agregación fibrilar amiloide de un fragmento de alrededor de 7,500 Da de la proteína SSA, que al parecer es escindida durante, o inmediatamente después del depósito. Esta amiloidosis es la forma sistémica más frecuente y afecta a individuos que padecen enfermedades inflamatorias de curso crónico, tanto de causa infecciosa como no infecciosa. Entre estas enfermedades destacan la artritis reumatoide y la fiebre mediterránea familiar (FMF). Es claro que el incremento durante un tiempo prolongado de la concentración sérica de la proteína SSA es un factor causal importante. Sin embargo, otros factores parecen determinar el incremento del riesgo de padecer amiloidosis AA, como son: Homocigosis para ciertos alotipos de SAA, y mutaciones en el gen de la proteína Pirina, que podrían estar relacionadas a una más extensa y prolongada inflamación en los casos de FMF (7). Es importante señalar que no todos los individuos que sufren enfermedades inflamatorias crónicas desarrollan amiloidosis AA.

IV. La amiloidosis por cadenas ligeras de inmunoglobulinas (AL).

Las cadenas ligeras de inmunoglobulinas. Estructura y función. Estas proteínas son una de las dos subunidades de la estructura básica los anticuerpos. La otra son las cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se componen de alrededor 220 aminoácidos y su masa molecular es de 23,000 Da; poseen dos dominios, el dominio variable (V_L) y el dominio constante (C_L). En ambos casos, la estructura terciaria es básicamente el de un “sándwich” de dos hojas β plegadas anti-paralelas, unidas por un puente disulfuro. Con base en la secuencia del dominio constante, las cadenas ligeras son clasificadas en dos tipos: Kappa (κ) y Lambda (λ). La secuencia de V_L es muy variable como resultado de procesos de recombinación génica y de mutaciones somáticas. La variabilidad se concentra especialmente en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs).

La amiloidosis AL es una “enfermedad conformacional”, generalmente causada por la agregación amiloide de un fragmento de cadena ligera, que comprende solamente el dominio variable (V_L), o éste y una pequeña porción del dominio constante (39). No se conocen los mecanismos moleculares de las amiloidosis de cadenas ligeras, no obstante se ha demostrado que estas proteínas comparten una característica común, una disminución en su estabilidad termodinámica (40). El uso de mutagénesis sitio-específica ha permitido demostrar una correlación inversa entre la estabilidad termodinámica y la tendencia amiloidogénica *in vitro* y que cambios en ciertas posiciones, que parecen ser críticas para la estabilidad de V_L , favorecen su agregación. Se asume que intermediarios semiplegados, juegan un papel importante en la formación de amiloide (41).

Uno de los hallazgos más intrigantes en la amiloidosis AL es la desproporcionada frecuencia del subgrupo λ_{VI} (Figura 6), presente en aproximadamente 20% del total de los casos (42). No obstante, es necesario aclarar que todos los sub-grupos mayores de V_L (κ y λ), han sido identificados en la enfermedad.

Terapias para revertir la formación de amiloides.

En los últimos años se ha intensificado la caracterización de las EPAPs con el objetivo de tener la información suficiente para proponer terapias que impidan o reviertan la formación de agregados proteicos.

Dentro de estos estudios, el uso de modelos animales ha sido primordial para conocer las bases moleculares y su relación con los síntomas de la enfermedad. Es posible inducir las características patológicas de algunas EPAPs en animales modelo, por la incorporación de genes humanos que poseen la mutación patológica. Los ratones transgénicos así obtenidos, reproducen las características observadas en las patologías originales, tales como daño cerebral, distrofia, alteraciones de la conducta etc. (43).



Figura 6. Estructura cristalográfica del dímero de la cadena ligera amiloidogénica Wil, perteneciente al subgrupo lambda VI. Generada en RasMol a partir del archivo 1CD0 del Protein Data Bank.

El estudio de los ratones transgénicos abre la posibilidad de proponer terapias para combatir a las EPAPs. Las terapias propuestas son variadas, y tiene en común el tratar de inhibir, revertir o atenuar los cambios conformacionales que causan la aparición del conformero que provoca la agregación.

Si se considera que tanto el plegamiento incorrecto como la agregación son las causas centrales de las patologías, la terapia se dirigiría a evitar la formación de las fibras amiloides, específicamente la transición entre hélices α y hojas β . Se ha propuesto el uso de minichaperonas, péptidos sintéticos diseñados para reconocer la región responsable de la asociación de los monómeros. Las minichaperonas poseen residuos que inhiben o favorecen la formación de un motivo específico. También se ha propuesto el diseño de péptidos inductores de hélices α , para favorecer la conformación normal de la proteína o bien el diseño de péptidos que desfavorecen la formación de hebras β (44).

Otro enfoque consiste en determinar la reversibilidad de la formación de los agregados. El uso de desnaturizantes como 5.0 M GdnHCl ha permitido obtener a la proteína Prp^{Sc} en una conformación semejante a la nativa. El objetivo de estos estudios es probar agentes terapéuticos que aumenten la disociación de los agregados con el fin

de encontrar agentes que puedan ser usados *in vivo* para disolver los depósitos de PrP, revertir la patología de la enfermedad y aliviar los síntomas (45).

En el caso de la “polineuropatía amiloide familiar” causada por mutaciones en la transtiretina (TTR), se sabe que la mutación (Val30Met) en los monómeros del tetrámero de la TTR causa una neuropatología. La mutación Thr119Met en el segundo alelo protege a los portadores de la primera mutación. Si esto es correcto, la incorporación del gen con la segunda mutación en los homocigotos Val30Met a través de técnicas de terapia génica permitiría la síntesis de la subunidad Thr119Met que actúa como supresor. También se propone la administración de subunidades Thr119Met para que sean incorporadas al tetrámero (46).

Un enfoque diferente es propuesto como resultado de la aplicación de un modelo matemático de nucleación-polimerización (47). Este modelo sugiere que la mejor estrategia es el diseño de un fármaco para bloquear los centros de nucleación, es decir, una molécula que interactúe con los extremos de las fibras e impida la elongación de las mismas. Por otra parte, de acuerdo a este modelo, no se recomendaría el uso de fármacos que provoquen la ruptura de las fibras, ya que esto sólo favorecería la formación de más centros de nucleación.

Evolución y plegopatias: Avances recientes.

Los sistemas biológicos han desarrollado diversos controles para que las proteínas se plieguen correctamente y lleven a cabo su función. Las proteínas adquieren su conformación tridimensional en un período de milisegundos a segundos. Aparentemente la presión evolutiva ha actuado no sólo para generar proteínas que adopten una conformación funcional y estable, sino para que adquieran la conformación nativa rápidamente. Dadas las patologías asociadas a la agregación proteica, es posible pensar que el plegamiento rápido tiene como fin evitar la agregación y la posterior formación de fibras amiloides.

Es claro que adquirir una conformación activa rápidamente, cumple no sólo la función de obtener proteínas activas en un tiempo corto (primordial para llevar a cabo las funciones celulares), sino también para evitar la acumulación de intermediarios propensos a la agregación.

Tomando en cuenta que el éxito de la vida radica en que las células lleven a cabo correctamente el proceso de obtención de proteínas funcionales a lo largo del tiempo, surgen las siguientes preguntas: ¿la formación de agregados es resultado de una grave falla celular (en cualquiera de los niveles posibles)?, o bien ¿tiene una función biológica específica y conservada a lo largo de la evolución?. Es difícil pensar en una función biológica de los agregados, debido a su incontrolable formación y depósito en las EPAPs, sin embargo, estudios temporales de inducción de algunas enfermedades amiloides en animales transgénicos, indican que las características de la enfermedad y los síntomas clínicos ocurren antes de que se detecten agregados. Esto ha permitido proponer al intermediario soluble mal plegado como el responsable de la

patogénesis. Estos grupos especulan que en realidad las especies tóxicas son las conformaciones solubles mal plegadas y que los agregados tienen como función biológica retirar a las primeras del sistema. Por lo tanto, los agregados amiloides podrían ser la respuesta celular para evitar un daño mayor (1). Recientemente dos grupos han encontrado evidencias que apoyan esta hipótesis. Uno de ellos encontró que, en presencia de trifluoroetanol, la proteína reguladora HypF de *E. coli* forma agregados que unen tioflavina T y que presentan estructura tipo β . El seguimiento temporal de estas estructuras indicó que a las 48 horas, se observaban protofibrillas, y 20 días después, la estructura era típicamente amiloide. La inyección de estos agregados amorfos o de las protofibrillas en células de rata y ratón, causan muerte celular, mientras que la inyección de las fibras amiloides no mata a las células (51).

Otro grupo, interesado en entender el papel patogénico de las fibras β amiloides en la enfermedad de Alzheimer, utilizó medio celular conteniendo diferentes especies observadas en el proceso de agregación de la proteína β amiloide. Los resultados de este trabajo muestran que al ser inyectados los dímeros y trímeros solubles del péptido A β a los cerebros de las ratas, afectan la función sináptica. Por otro lado, la inyección de los monómeros A β y los oligómeros inhibe la potenciación a largo plazo del hipocampo (proceso responsable del establecimiento de la memoria y el aprendizaje) (52).

Ambos reportes sugieren entonces, que las fibrillas efectivamente no son las causantes de los procesos patológicos característicos de la enfermedad, y que el daño celular en realidad es causado por intermediarios de plegamiento mal plegados que constituyen una especie tóxica para las células.

Esquema 1. Termodinámica y cinética en el plegamiento de proteínas

La estructura covalente determina la libertad conformacional de los átomos en las moléculas. En condiciones fisiológicas todas las proteínas que presentan una determinada estructura covalente suelen adoptar una conformación tridimensional semejante, con pequeñas variaciones localizadas. A esta conformación se le conoce como conformación nativa (N). Las funciones de las proteínas se llevan a cabo gracias a las propiedades del estado nativo.

Las proteínas contienen miles de enlaces covalentes que pueden rotar, por lo que el estado nativo es sólo uno entre un número astronómico de posibles conformaciones de la cadena. Entre los estados no nativos podemos distinguir al estado desnaturalizado (U), obtenido mediante temperaturas elevadas, pHs extremos o por la adición de agentes químicos como la urea y el cloruro de guanidina. Como U carece de estructura definida (secundaria, terciaria y cuaternaria), se postula que sus propiedades son semejantes a las presentes justo después de la síntesis de la proteína por los ribosomas.

En algunos casos, la transformación entre U y N puede llevarse a cabo *in vitro*, utilizando proteínas purificadas, en ausencia de cofactores celulares o entrada de energía. Esto significa que el plegamiento es una transformación conformacional que puede caracterizarse con las herramientas fisicoquímicas comúnmente utilizadas para la descripción de reacciones químicas.

La constante de equilibrio (K_{eq}) para el plegamiento de proteínas se define como el cociente de la concentración de moléculas en el estado nativo ($[N]$) entre la concentración de éstas en el estado desnaturalizado ($[D]$). Esto es, $K_{eq} = [N]/[D]$. Si la K_{eq} es conocida, la diferencia de energía que acompaña a la transformación de U a N ($\Delta G_{PLEG} = G_N - G_U$), puede calcularse mediante la siguiente ecuación $\Delta G_{PLEG} = -RT \ln K_{eq}$ (donde T es la temperatura absoluta y R es la constante de los gases ideales). En condiciones fisiológicas el estado nativo es predominante ya que la energía asociada a las moléculas en el estado U (G_U) es mayor que la energía asociada a las moléculas en el estado N (G_N). En estas condiciones, la K_{eq} es mayor a uno y el ΔG_{PLEG} es negativo, esto es, el plegamiento es espontáneo como se puede apreciar en la figura E1.1:

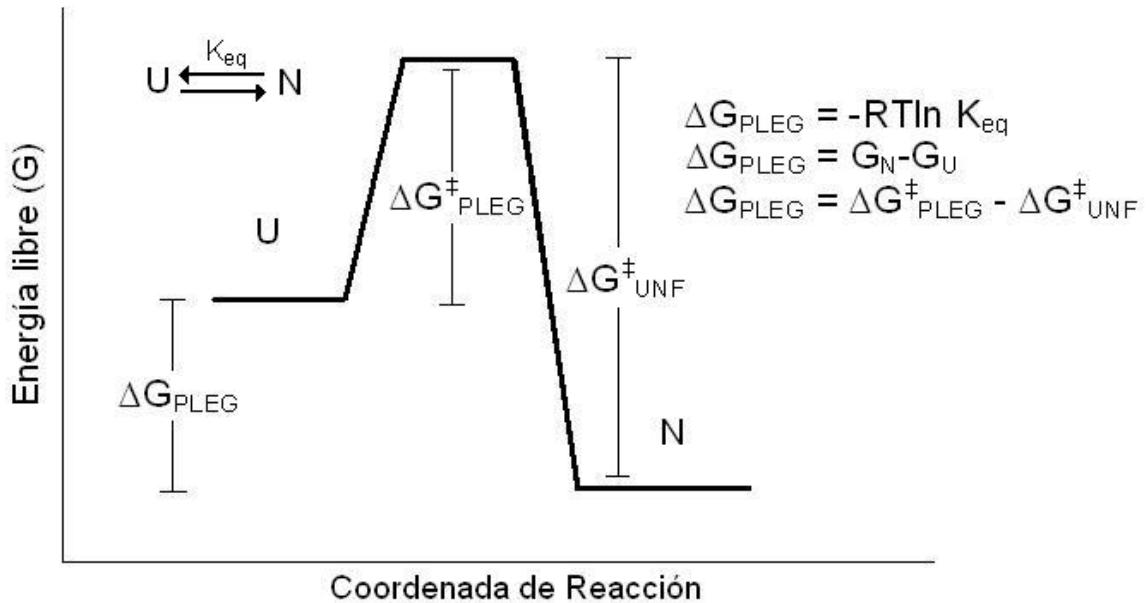


Figura E.1.1 Diagrama de energía para el proceso de plegamiento de una proteína.

La transformación entre U y N puede también entenderse como resultado de dos fenómenos opuestos. El plegamiento de U, caracterizado por una constante de velocidad de plegamiento k_{PLEG} y el desplegamiento de N, descrito mediante la velocidad de desnaturalización k_{UNF} . Utilizando la teoría del estado activado de Eyring,

es posible obtener la energía de activación (ΔG^\ddagger) asociada a las velocidades de reacción ($\Delta G^\ddagger_{\text{PLEG}}$ y $\Delta G^\ddagger_{\text{UNF}}$) mediante: $k_{\text{PLEG}} = (k_b T/h) \exp(-\Delta G^\ddagger_{\text{PLEG}}/RT)$ y $k_{\text{UNF}} = (k_b T/h) \exp(-\Delta G^\ddagger_{\text{UNF}}/RT)$; donde k_b es la constante de Boltzman y h es la constante de Planck.

Finalmente, los parámetros termodinámicos y los cinéticos están relacionados mediante $\Delta G_{\text{PLEG}} = \Delta G^\ddagger_{\text{PLEG}} - \Delta G^\ddagger_{\text{UNF}}$. Las relaciones entre estos parámetros se aprecian gráficamente en la figura E.1.1, la cual describe un proceso de dos estados, esto es, aquel en el que las únicas conformaciones presentes son U y N.

En algunos procesos se observan estados intermedios (I), claramente diferenciables de U y N. El perfil de energía que corresponde a este caso, se muestra a continuación.

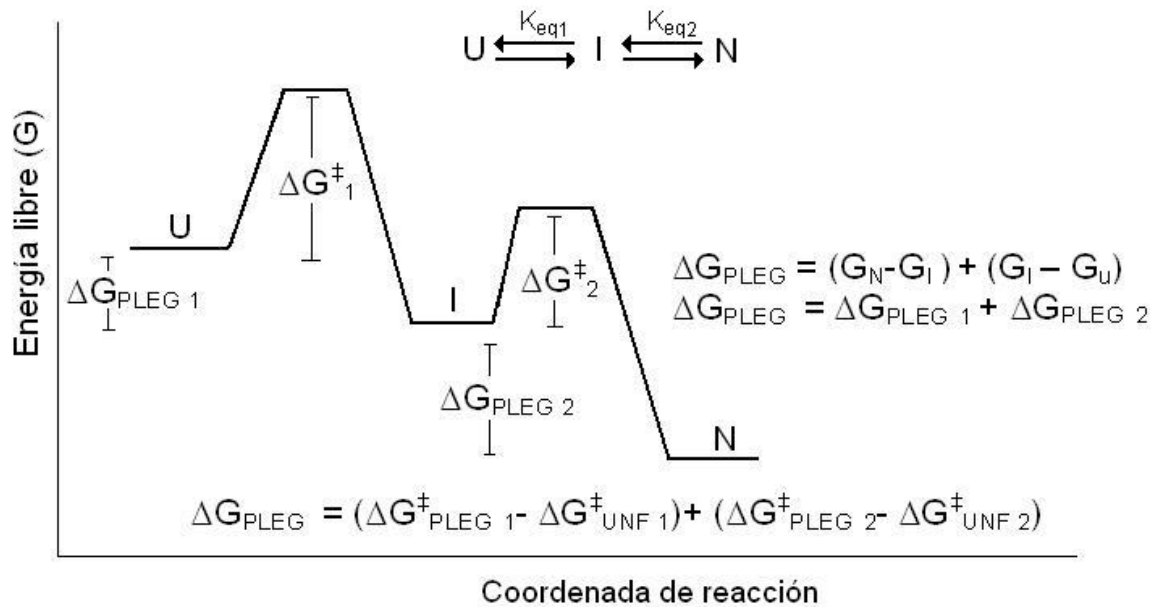


Figura E.1.2 Plegamiento de una proteína a través de un intermediario.

Esquema 2. Control cinético y control termodinámico.

La formación de amiloides puede deberse a cambios en la estabilidad o en la cinética. A continuación se utiliza el caso de la proteína priónica más famosa, PrP. Esta proteína puede existir en dos conformaciones diferentes, la forma nativa soluble PrP^C y la forma patológica (amiloide) PrP^{Sc}.

La transición $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ puede describirse como una reacción de plegamiento. En condiciones normales, el equilibrio entre estas formas favorece la presencia de PrP^{C} , ya que este estado es el de menor energía, sin embargo, la presencia de mutaciones en el gen que codifica para PrP puede alterar el proceso a dos niveles: a) Modificando mayoritariamente la estabilidad (control termodinámico) (Figura E.2.1) o b) Modificando principalmente las energías de activación del proceso (control cinético) (Figura E.2.2) (48). Es importante aclarar que es imposible obtener efectos puramente cinéticos o termodinámicos, ya que ambos están íntimamente ligados.

Al hablar de control termodinámico, el efecto de la mutación recae mayoritariamente en la diferencia de energía entre PrP^{C} y PrP^{Sc} , esto es, $\Delta G_{\text{PrP}(\text{C-Sc})} < 0$, de tal manera que en la proteína mutante, la conformación amiloide es más estable que la conformación soluble (Figura E.2.1).

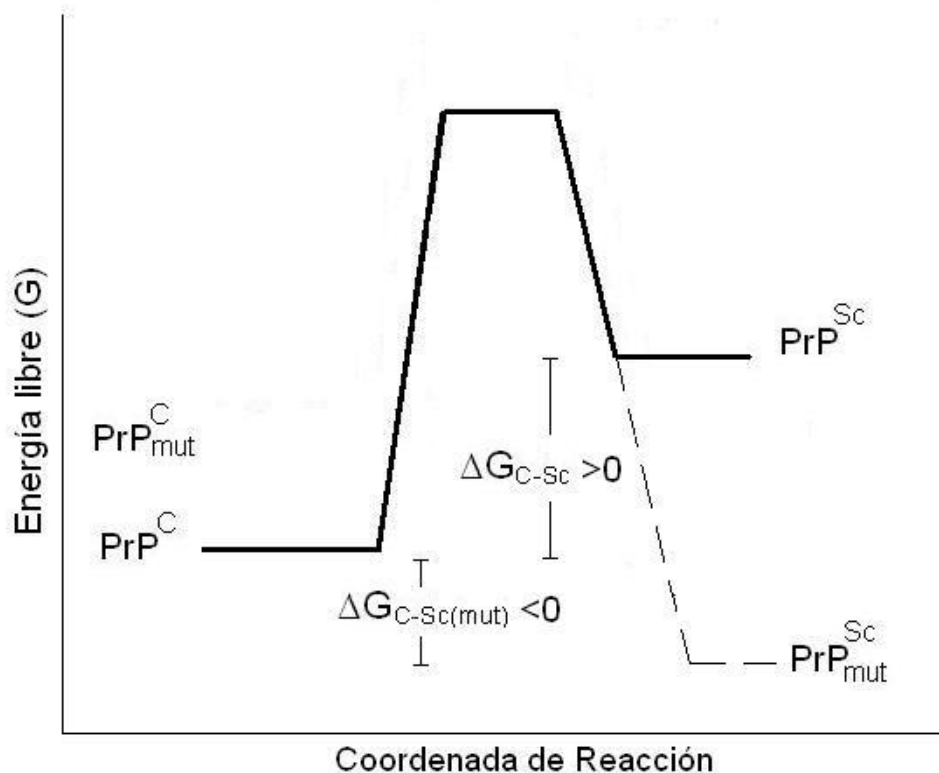


Figura E.2.1. Las mutaciones pueden afectar la estabilidad del estado nativo con respecto al estado amiloide (ΔG), haciéndola más susceptible a formar amiloides ($\Delta G_{\text{C-Sc}} > \Delta G_{\text{C-Sc}(mut)}$).

El control cinético se centra en los cambios en la energía de activación que acompañan a la formación de las fibrillas ($\Delta G^{\ddagger}_{\text{PrP}(\text{C-Sc})}$). En este contexto, el efecto principal de las mutaciones es disminuir el $\Delta G^{\ddagger}_{\text{PrP}(\text{C-Sc})}$. Por lo tanto, la proteína silvestre

no forma agregados ya que debe atravesar una barrera más grande que la mutante para convertirse en PrP^{Sc} (Figura E.2.2). Cambios relativamente pequeños (1.5-3.0 kcal) en el ΔG^\ddagger pueden incrementar la cinética de agregación casi 100 veces, si este es el paso limitante para la agregación (48). Por otra parte esta isoforma patológica podría actuar como “catalizador” de la reacción de agregación al servir de “molde” para llevar a PrP^{C} a un estado activado (de transición), amplificando el factor cinético. Esta posibilidad implica que se reconsidere la posición de las proteínas dentro del dogma central de la biología molecular, el cual dicta el flujo de información en los sistemas biológicos.

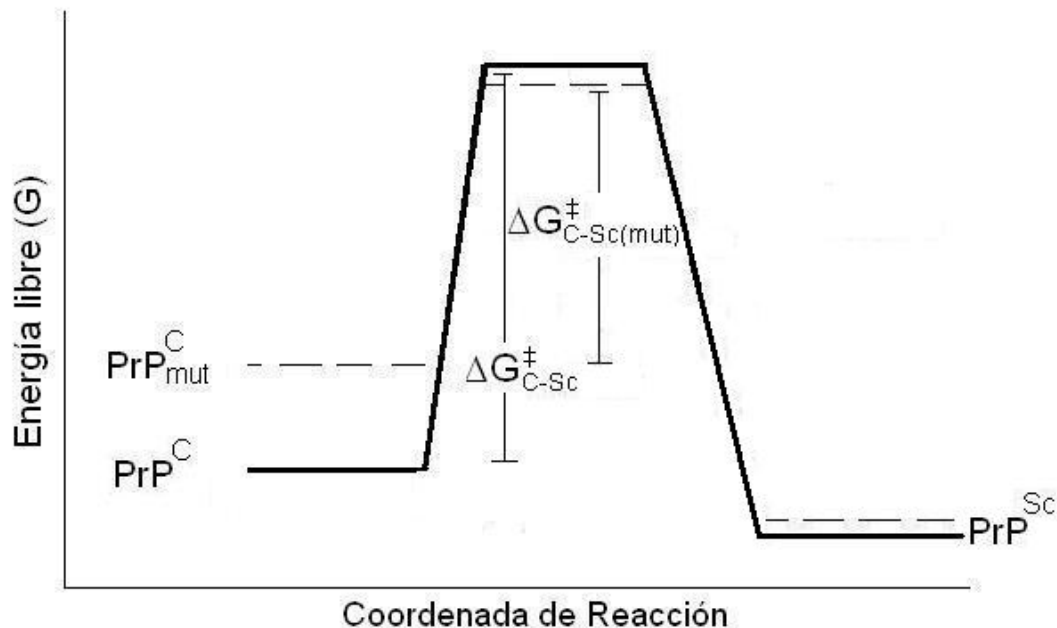


Figura E.2.2. Las mutaciones pueden afectar la velocidad en que la proteína se agrega, disminuyendo la barrera de activación entre la conformación nativa y la conformación agregada ($\Delta G_{\text{C-Sc}}^\ddagger > \Delta G_{\text{C-Sc(mut)}}^\ddagger$).

Las evidencias experimentales acumuladas no diferencian claramente entre ambas opciones. En la proteína priónica de levadura Ure2 se determinó la estabilidad de la proteína completa y de varias mutantes en las cuales se removió el dominio priónico. Sorprendentemente, tanto los parámetros termodinámicos como los cinéticos de las variantes son semejantes a los de la proteína nativa (49). Las semejanzas en los parámetros fisicoquímicos de ambas proteínas probablemente indican que factores extrínsecos o condiciones fuera del equilibrio, influyen en su capacidad para formar amiloides. Por otra parte, dos variantes amiloidogénicas de la lisozima humana muestran diferencias en las constantes de velocidad de desplegamiento y replegamiento, a pesar de esto, al compararlas con la proteína silvestre, ambas muestran una disminución semejante en estabilidad (50).

REFERENCIAS

1. Dobson. C. M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci* 24: 329-332
2. Virchow, R. (1854). Zur Cellulose-Frage. *Virchows Arch* 6: 415-426.
3. Missmahl, H. P. & Hartwig, M. (1953). Polarisationsoptische Untersuchungen an der Amyloids substanz. *Virchows Arch Path Anat* 324: 489-508.
4. Cohen, A. S. & Calkins, E. (1959). Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origin. *Nature* 183: 1202-1203.
5. Eanes, E. D. & Glenner, G. G. (1968). X – Ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* 16: 673-677.
6. Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., & Takeda (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T. *Anal Biochem* 177: 244-249
7. Buxbaum J. N. & Tagoe C. E. (2000) The genetic of the amyloidoses. *Annu Rev Med* 51: 543-569.
8. Shirahama, T & Cohen, A. S. (1967) High resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J Cell Biol* 33: 679-706.
9. Cohen, A. S., Shirahama, T & Skinner, M. (1981) Electron microscopy of amyloid. En: *Electron Microscopy of Protein*, I. Harriss (Ed) London: Academic Press
10. Fändrich, M., Fletcher, M. A. & Dobson, C. M. (2001) Amiloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 410: 165-166
11. Chitti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. & Dobson; M. (1999) Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 96: 3590-3594
12. Uversky, V.N., Lee, He, Jin., Li, Jie., Fink, A.L. & Lee S.J. (2001) Stabilization of partially folded conformation during α -synuclein oligomerization in both purified and cytosolic preparations. *J Biol Chem* 276 (47): 43495- 43498
13. Jackson, G. S., Hosszu, L.L., Power, A., Hill, A.F., Kenney, J., Saibil, H., Craven, C.J., Waltho, J. P., Clarke, A. R. & Collinge, J. (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* 283: 1935- 1937
14. Welker, E., Wedemeyer, W. J. & Sheraga, H. A. (2001) A role for intermolecular disulfide bonds in prion diseases? *Proc Natl Acad Sci (USA)* 98 (8): 4334-4336
15. Alonso, D. O. V., De Armond, S. J., Cohen, F. E. and Daggett, V. (2001) Mapping the early steps in the pH-induced conformational conversion of the prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (6): 2985-2989
16. Imaizumi, K., Miyoshi, K., Katayama, T., Yoneda, T., Taniguchi, M., Kudo, T. & Tohyama, M. (2001) The unfolded protein response in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Acta* (1536): 85-96
17. Wickner, S., Maurizi, M.R. & Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286: 1888-1893
18. Prusiner, S.B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278: 245-251.
19. Cohen, F.E. & Prusiner, S.B. (1998) Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem* 67: 793-819.

20. Wickner, R. B., Edskes, H. K., Maddelein, M-L., Taylor, K. L. & Moriyama, H. (1999) Prions of yeast and fungi. *J Biol Chem* 274 (2): 555-558
21. Weissman, C. (1999) Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies *J Biol Chem* 274: 3-6
22. Noguchi, C.T. & Schechter, A.N. (1985) Sickle hemoglobin polymerization in solution and in cells. *Annu Rev Biophys Byophys Chem* 14: 239-263.
23. Ferreira, S., T. & De Felice, F. G. (2001) Protein dynamics, folding and misfolding: from basic physical chemistry to human conformational diseases. *FEBS Lett* 498: 129-134
24. Evans D.A., Funkentein H.H., Albert M.S., Scherr P.A., Cook N.R., Chown M.J., Hebert L.E., Hennekens C.H., Taylor J.O. (1989) Prevalence of the Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *J Am Med Assoc* 262: 2551-2556
25. Sandbrink R., Master C.L., Beyreuther K. (1996) APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann NY Acad Sci* 777: 281-87
26. Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N., Ihara Y. (1994) Visualization of A beta 42(43)-positive and A beta 40-positive senile plaques with end-specific A beta-monoclonal antibodies: evidence that an initially deposited A beta species is A beta 1-42(43). *Neuron* 13: 45-53
27. Citron M., Oltersdorf T., Haass C., McConlogue L, Hung A.Y., Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Lieberburg I., Selkoe D.J. (1992) Mutation of the beta amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360: 672-674.
28. Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C.E., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973-977
29. Kanda, Y., Goodman, D. S. Canfield, R. E. & Morgan, F.J. (1974) The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J Biol Chem* 249: 6796-805
30. Blake C.C.F., Geisow M. J., Oatley S. J. (1978) Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8Å. *J Mol Biol* 121: 339-56
31. Whitehead A. S., Skinner M., Bruns G.A.P., Costello W., Edge M.D., Cohen A.S., Sipe J.D. (1984) Cloning of the human pralbumin complementary DNA. Localization of the gene to chromosome 18 and determination of a variant prealbumin allele in a family with familial amyloid polyneuropathy. *Mol Biol Med* 2: 411-423
32. Monaco H.L., Rizzi M., Coda A. (1995) Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science* 268: 1039-41
33. Proc. Int. Symp. Fam. Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Relat. Disord., (1999).4th, Int. Workshop Liver Transplant. Fam. Amyloid Polyneuropathy, 3rd, June 3-5, Umea, Sweden
34. Kelly J.W. & Lansbury P.T. Jr. (1994) A chemical approach to elucidate the mechanism of transthyretin and beta-protein amyloid fibril formation. *Amyloid: Int. J Exp Clin Invest* 1: 186-205
35. Andrade C. (1952) A peculiar form of peripheral neuropathy. Familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* 75: 408-27

36. Sakoda S., Suzuki T., Higa S., Ueji M., Kishimoto S., Wada Y., Hayashi A., Matsumoto H., Miyazaki T., Sasazuki T. (1983) Genetic studies of familial amyloid polyneuropathy in the Arao district of Japan:1. The genealogical survey. *Clin Genet* 24: 334-38
37. Sunde M., Blake C.C.F. (1998) From globular to fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Q Rev Biophys* 31(I): 1-39
38. Liepnieks, J.J., Kluge-Beckerman B., Benson, M.D. (1995) Characterization of amyloid A protein in human secondary amyloidosis: the predominant deposition of serum amyloid A1. *Biochim Biophys Acta* 1270: 81-86
39. Cohen A S. (1993) Primary (AL) Amyloidosis. *Renal Failure* 15(3): 429-433
40. Wetzel R. (1997) Domain Stability In Immunoglobulin Light Chain Deposition Disorders. *Adv Prot Chem* 50: 182-242
41. Khurana R., Gillespie J.R., Talapatra A., Minert L.J., Ionescu-Zanetti C., Millet I., Fink A. (2001) Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry* 40: 3525-3535
42. Solomon A., Frangione B., Franklin E.C. (1982) Preferential association of the V λ VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL. *J Clin Invest* 70: 453-460
43. Cohen, F.E. (2000) Prions, peptides and protein misfolding. *Mol Med Today* (6): 292-293
44. Soto, C. (2001) Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett* 498: 204-207
45. Callahan, M. A., Xiong, L., Caughey, B. (2001) Reversibility of scrapie-associated prion protein aggregation. *J Biol Chem* 76 (30): 28022-28028
46. Hammarström. P., Schneider, F. & Kelly, J. (2001) *Trans*-suppression of misfolding in an amyloid disease. *Science* 293: 2459-2462
47. Massel, J. & Jansen, V.A.A. (2000) Designing drugs to stop the formation of prion aggregates and other amyloids. *Biophys Chem* 88: 47-59.
48. Cohen, F.E. (1999) Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol* 293: 313-320
49. Galani, D., Fersht, A. & Perrett, S. (2002) Folding of the yeast prion protein Ure2: Kinetic evidence for folding and unfolding intermediates. *J Mol Biol* 315: 213-227
50. Canet, D., Sunde, M., Last, A. M., Miranker, A., Spencer, A., Robinson, C. V. & Dobson, C. M. (1999) Mechanistic studies of the folding of human lysozyme and the origin of amyloidogenic behavior in its disease-related variants. *Biochemistry* 38: 6419-6427
51. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chitti, F., Baroni, F., Formigli, L., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M. & Stefani, M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416: 507-511
52. Walsh, D., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. & Selkoe, D. J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 416: 535-539.



Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E, (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVI**. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2002).

(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

MECANISMOS MOLECULARES DE LA PATOGENIA VIRAL: ESTUDIOS CON EL *RUBULAVIRUS PORCINO*.

**Julio Reyes Leyva,¹ Gerardo Santos,¹ Jesús Hernández,² Blanca Espinosa,³
María del Tránsito Borraz,¹ Humberto Ramírez,³ Verónica Vallejo,¹
y Edgar Zenteno⁴**

¹Lab. de Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS,
19 sur 4717 Col. Reforma Agua Azul, 72430 Puebla.

²Depto. de Nutrición Animal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo,
Hermosillo, Son.

³Depto. Producción Animal Cerdos, Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

⁴Lab. Inmunología, Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM.

jreyesleyva@correo.unam.mx

Introducción.

Este capítulo discutirá algunos de los principios de la patogenia viral, el proceso completo mediante el cual los virus producen enfermedad. Los términos virulencia y patogenicidad, que describen la capacidad de un virus de producir enfermedad, son considerados algunas veces como sinónimos; sin embargo, la patogenicidad se refiere al tipo de alteraciones producidas por una infección que puede compararse entre virus diferentes, mientras que la virulencia se refiere a la severidad del daño causado por diversas cepas del mismo virus. Por ejemplo, el virus de la rabia es más patogénico que el virus del sarampión, ya que aunque los dos virus infectan sistema nervioso central, las

alteraciones que produce el virus rábico son más dañinas que las producidas por el del sarampión. En relación a la virulencia, también se pueden presentar diferencias notables, por ejemplo, dos cepas del virus rábico inoculadas en el cerebro del ratón pueden causar lesiones neurológicas, ambas son patogénicas; pero sólo 10 viriones de la cepa A pueden matar al ratón, mientras que se requieren 10,000 viriones de la cepa B para producir la muerte. La cepa A es mil veces más virulenta que la cepa B.

No obstante la aparente simplicidad estructural de los virus, una infección viral involucra diversos procesos, algunos de ellos tan simples como las interacciones mediadas por cargas electromagnéticas; otros involucran diversas actividades enzimáticas y otros más pueden llegar a formar complejos sistemas de activación de señales y reguladores genéticos. Ante esta diversidad de eventos el organismo ha desarrollado un complejo sistema de defensa que lo protege de la mayoría de las infecciones virales; sin embargo, los virus son capaces de adaptarse a las adversidades del medio, evadir la respuesta inmune y, a pesar de lo que anteriormente se pensaba, evolucionar para perpetuar su especie. Por lo tanto, abordar el estudio de la patogenicidad viral equivale a estudiar la suma de los efectos en el hospedero debidos a la replicación viral y a la respuesta inmune.

El interés en la patogenicidad viral se deriva en gran parte del deseo de eliminar enfermedades virales que afectan al hombre, sin embargo, el progreso en el conocimiento de las bases moleculares de la patogenicidad viral ha venido de estudios experimentales en modelos animales, en los que se utilizan virus estrechamente emparentados, con características patológicas similares. Ya que los animales son organismos complejos, el estudio de la patogenicidad viral envuelve un amplio rango de tópicos entre los que surgen las siguientes preguntas: ¿cómo ingresan los virus al organismo?, ¿cómo se propagan en el interior?, ¿por qué determinados tejidos son los sitios de replicación viral?, ¿cómo causan daño celular? y ¿cómo participa el sistema inmune en la generación del daño a los tejidos?. Antes de dar respuesta a estas preguntas, nos centraremos en la descripción del que ha sido nuestro modelo de estudio por más de diez años, el *Rubulavirus porcino* (RVP).

Los paramixovirus son virus patógenos¹.

Los paramixovirus conforman una familia de virus que producen importantes problemas a la salud humana y veterinaria (1). Entre los paramixovirus se encuentran el virus sincitial respiratorio y los virus de parainfluenza, causantes de infecciones de vías

¹ No todos los virus son patógenos. Existen virus que han sido aislados al trabajar con diversas líneas celulares o tejidos, sin que se les demuestre una real capacidad patogénica, como los retrovirus endógenos identificados en células de origen porcino utilizadas para xenotransplantes del cerdo al hombre. Copias del genoma de este virus se encuentran en todas las células porcinas sin que manifiesten alteración aparente. No obstante, se ha logrado replicar experimentalmente a estos virus en líneas celulares humanas lo que sugiere una potencial capacidad patogénica para la especie humana.

respiratorias bajas en niños y animales jóvenes (1,2). Dentro de esta familia también se incluyen virus que producen infecciones neurológicas y sistémicas, como el virus del sarampión, el del moquillo canino, el de la enfermedad de Newcastle aviar y el de la parotiditis humana.

El virus de la parotiditis es reconocido por producir inflamación de las glándulas salivales parótidas, sin embargo, en casi la mitad de los casos hay complicaciones neurológicas como meningitis, las cuales pasan desapercibidas o son mal diagnosticadas, pero que causan un importante detrimento a la salud y al desarrollo infantil. En ocasiones, la infección viral puede abarcar el parénquima nervioso produciendo encefalitis, la cual deja graves secuelas nerviosas en los niños afectados. Aunado a esto, el virus de la parotiditis se replica en diversos tejidos linfáticos y glandulares, incluyendo las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, por lo que se le ha asociado con la generación de diabetes y también puede replicarse en células epiteliales y germinativas de órganos reproductivos masculinos causando inflamación testicular y esterilidad en jóvenes postúberes (3).

El virus que utilizaremos como modelo en esta revisión, el *Rubulavirus porcino*, posee gran similitud estructural y genética con el virus de la parotiditis humana y comparte con él su tropismo tisular y sus características patológicas, ya que también provoca alteraciones en sistema nervioso central de cerdos neonatos y en tejido reproductivo en cerdos adultos; además, es capaz de replicarse en diversos tejidos glandulares y linfáticos, por lo que es un modelo adecuado para estudiar los factores de patogenicidad de los paramixovirus.

Estatus taxonómico.

La familia *Paramyxoviridae* (Tabla I) agrupa virus envueltos, cuyo genoma está constituido por una cadena de ácido ribonucleico (ARN) en sentido negativo,² dividida en seis o siete genes que codifican para un número igual o mayor de proteínas estructurales y no estructurales, incluyendo su propia polimerasa de ARN. Los miembros de esta familia se clasifican en diferentes géneros de acuerdo a sus propiedades estructurales y biológicas, siendo determinante la presencia de las actividades hemaglutinante y neuraminidasa y el grado de similitud de sus secuencias genéticas (4,5). Los paramixovirus son muy variables y llegan a registrar en promedio una mutación por cada diez mil bases durante cada replicación, en contraste con otros organismos cuyos genomas son más estables, como por ejemplo en humanos, donde se registra una mutación por cada mil millones de bases replicadas. Por ello se dice que este tipo de

² Los virus con genoma de ARN de cadena negativa tienen su secuencia en sentido opuesto a la secuencia del ARN mensajero, por lo tanto su ARN genómico no puede participar directamente en la traducción y síntesis de proteínas; mientras que los virus de cadena positiva tienen un genoma con el mismo sentido que el ARN mensajero, por lo cual el ARN genómico puede participar directamente en la síntesis de proteínas.

entidades autorreplicantes (en general los virus de ARN) son los de mayor capacidad mutagénica en la naturaleza (6). Además, son frecuentes las publicaciones que reportan la aparición de variantes o incluso nuevas especies de la familia *Paramyxoviridae* (7-13). Los virus emergentes, o virus conocidos que resurgen con mayor virulencia, llegan a ocasionar graves problemas de identificación, prevención, tratamiento y eliminación (14).

Particularmente en el género *Rubulavirus*, se han identificado nuevas especies patógenas en diferentes partes del mundo (10-13). En la mayoría de los casos se han aislado virus emergentes que infectan animales domésticos o silvestres (cerdos, aves de corral o murciélagos). Sin embargo, también se han identificado virus causantes de zoonosis, como los recién descubiertos paramixovirus de Hendra (caballos), de Nipah (cerdos) y de Menangle (cerdos), que además de los daños ocasionados a su principal especie hospedera presentaron casos mortales en humanos que estuvieron en contacto con los animales infectados (15).

Tabla I. Organización Taxonómica de la Familia *Paramyxoviridae*.

| Subfamilia | Género | Patógenos Importantes |
|------------------------|---------------------------|---|
| <i>Paramyxovirinae</i> | <i>Respirovirus</i> | V. Parainfluenza 1, 3; V. Sendai |
| | <i>Rubulavirus</i> | V. Parotiditis, <i>Rubulavirus Porcino</i> V. Parainfluenza 2, 4; V. Enf. de Newcastle |
| | Nuevo género ¹ | V. Hendra, V. Nipah |
| | <i>Morbillivirus</i> | V. Sarampión, V. Moquillo Canino |
| <i>Pneumovirinae</i> | <i>Pneumovirus</i> | V. Sincitial Respiratorio |
| | <i>Metapneumovirus</i> | V. de Rinotraqueitis del Pavo ² |

Esta familia viral está formada por patógenos conocidos y por nuevas variantes virulentas.

¹ Género aún no determinado, todos ellos son virus emergentes causantes de zoonosis.

² Recientemente se identificaron variantes de este virus que producen zoonosis.

Tabla construida a partir de las referencias 4, 5, 13 y 15.

Estructura viral.

Los rubulavirus están constituidos por seis proteínas estructurales (16): la nucleoproteína (NP), la fosfoproteína (P) y la proteína de alto peso molecular (L), se encuentran asociadas al genoma viral; mientras que la proteína de matriz (M) y dos glicoproteínas, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y las glicoproteínas de fusión (F1 y

F2) se localizan en la membrana viral. En la Figura 1 puede observarse la estructura de un virión típico de rubulavirus. Las glicoproteínas HN y F son transmembranales y su mayor parte se encuentra expuesta al exterior del virión, dejando un pequeño segmento intraviral que hace contacto con la proteína M, que se ubica en la parte interna de la membrana. Las unidades de NP se unen mediante interacciones hidrofóbicas al ARN genómico para dar origen a la nucleocápside; cada NP se enlaza a seis nucleótidos inmediatamente después de la síntesis del ARN genómico y no se separan durante la replicación ni la transcripción, así que a diferencia de los virus de ARN positivo, el genoma de los virus de ARN negativo nunca se encuentra desnudo. Esto último es muy importante para la sobrevivencia de los virus dentro de la célula porque ésta posee diversos mecanismos para eliminar las moléculas de ARN de cadena sencilla que se encuentren en el citoplasma (1). A la nucleocápside se asocian cerca de 50 complejos con actividad de ARN polimerasa. Cada uno de ellos está formado por 3 unidades de proteína P (P_3) y una unidad de proteína L, esta última actúa como componente catalítico de la polimerasa y posee otras actividades relacionadas con la transcripción y replicación del genoma viral (1,17). Otras dos proteínas, V y C, se han identificado en las células infectadas pero no forman parte de la estructura del virión; éstas son codificadas por el genoma viral y se sintetizan al editarse el gen P (18). Al parecer estas proteínas participan en la regulación de la transcripción y la replicación viral.

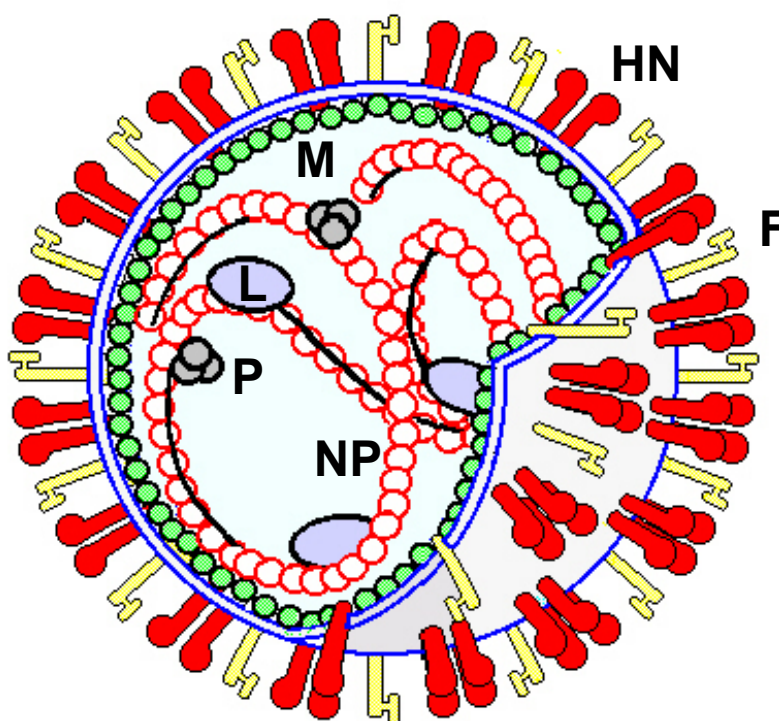


Figura 1. Esquema del *Rubulavirus porcino* y sus proteínas estructurales. En la membrana se encuentran las glicoproteínas HN y F, en la parte interna de la misma se ubica la proteína de matriz M. Íntimamente ligada a la cadena de ARN se encuentran las nucleoproteínas (NP) que conforman la nucleocápside helicoidal y las proteínas P y L que constituyen el complejo con actividad polimerasa del virus (de acuerdo con los datos de las referencias 1, 4, 16 y 19).

Ciclo biológico.

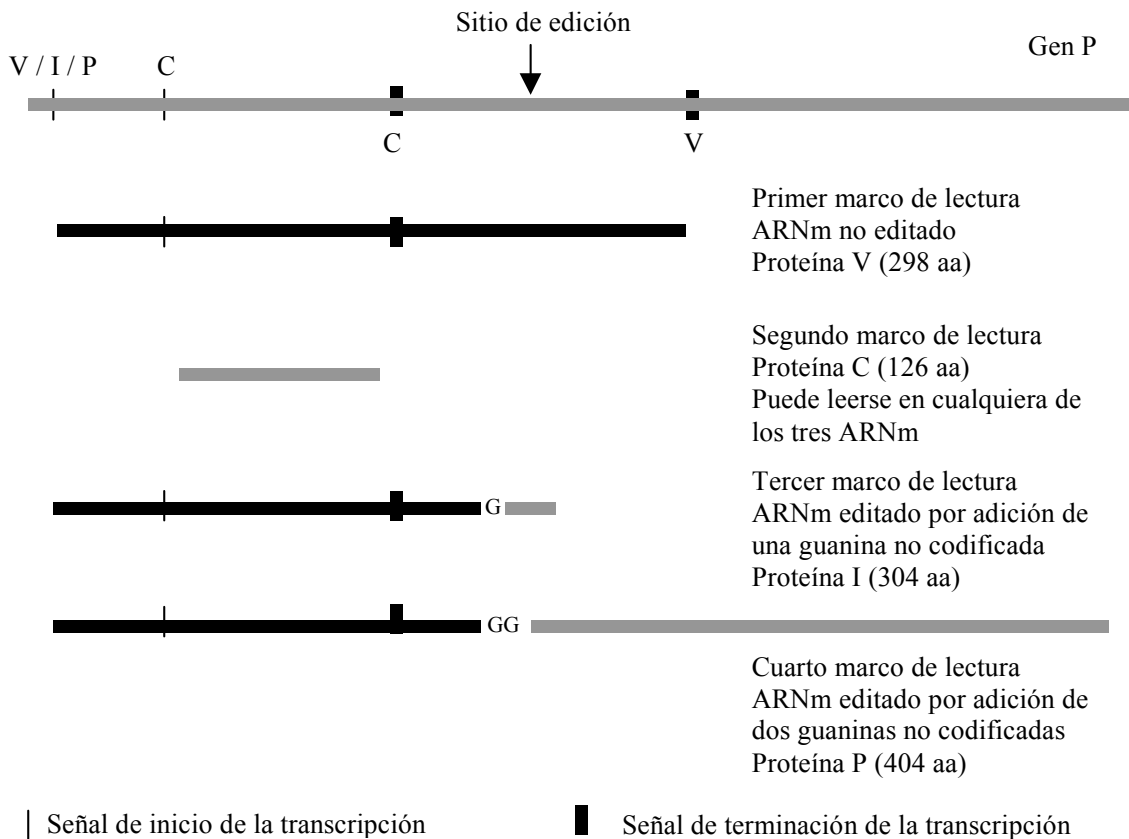
El ciclo biológico de los rubulavirus incluye las fases de reconocimiento, adsorción a la superficie celular, fusión de membranas, penetración a la célula, desnudamiento, transcripción, replicación del genoma, ensamble y liberación de viriones (Figura 2). La partícula viral se adsorbe a la membrana de la célula por medio de la proteína HN, que reconoce un receptor específico, generalmente glicosilado. Un cambio conformacional de la HN activa la proteína F, que expone un dominio altamente hidrofóbico mediante el cual fusiona las membranas celular y viral. Este evento ocurre en la superficie celular y a pH neutro, por lo que es independiente de enzimas lisosomales, como ocurre en otros virus. La integración de la membrana viral al sistema de membranas celulares provoca la liberación de la nucleocápside en el citoplasma. Ya que el virión trae integrada su propia polimerasa, al liberarse el ARN viral se sintetiza una copia completa del genoma en sentido positivo que servirá de molde para los nuevos genomas, y por otro lado, se inicia la síntesis de los ARN mensajeros que codifican cada una de las proteínas virales. Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, en donde las proteínas NP, P y L son acopladas al ARN recién sintetizado y la proteína M se acumula en la parte interna de la membrana celular. Las glicoproteínas HN y F que fueron sintetizadas en el retículo endoplásmico, son modificadas en el aparato de Golgi y posteriormente expresadas en la cara externa de la membrana, en sitios de contacto estrecho con la proteína M. La afinidad de las proteínas de la nucleocápside, NP, con la proteína M y de ésta con las glicoproteínas es determinante para el ensamble del virión, que es liberado de la célula por exocitosis (1). La replicación de los rubulavirus se realiza totalmente en el citoplasma, por lo cual se forman aglomerados de nucleocápsides que se observan como grandes inclusiones citoplasmáticas en las células infectadas (20).

El material genético viral también puede pasar directamente de una célula infectada a una célula vecina sin que haya necesidad de que se libere la partícula viral, esto es debido al proceso de fusión de membranas celulares realizado por las proteínas HN y F. De esta manera se originan las células gigantes multinucleadas o sincitios (Figura 3) características de las infecciones por paramixovirus (1).

Enfermedad del ojo azul.

El *Rubulavirus porcino* es un virus emergente de importancia veterinaria que es responsable de la enfermedad del ojo azul de los cerdos. Este padecimiento consiste en alteraciones neurológicas, respiratorias y reproductivas, acompañadas en 1 a 10% de los casos por opacidad de la córnea (21). La identificación inicial de la enfermedad se realizó en 1980, en granjas porcinas de La Piedad, Michoacán. A partir de ahí el padecimiento se difundió rápidamente a otros poblados en Michoacán, Guanajuato y Jalisco, lugares que hoy persisten como focos de infección (22).

Cuadro 1. Edición genética. Algunos paramixovirus sufren un proceso de edición genética durante su transcripción. En el rubulavirus porcino este proceso ocurre en el gen P, que contiene dos marcos de lectura abiertos, uno codifica la proteína V y el otro codifica la proteína C. Sin embargo, al editarse pueden aparecer otros dos marcos de lectura más. En este proceso la polimerasa puede incorporar en un sitio específico una guanina (G) no codificada, haciendo que el marco de lectura termine antes que el de la proteína V, dando origen a la proteína I. La polimerasa también puede insertar dos guaninas (GG) originando un marco de lectura de mayor tamaño que codifica la proteína P. La proteína C puede ser traducida de cualquiera de los tres ARNm, ya sea el no editado, que da origen a la proteína V, o bien, de los ARNm editados que codifican para las proteínas I o P.



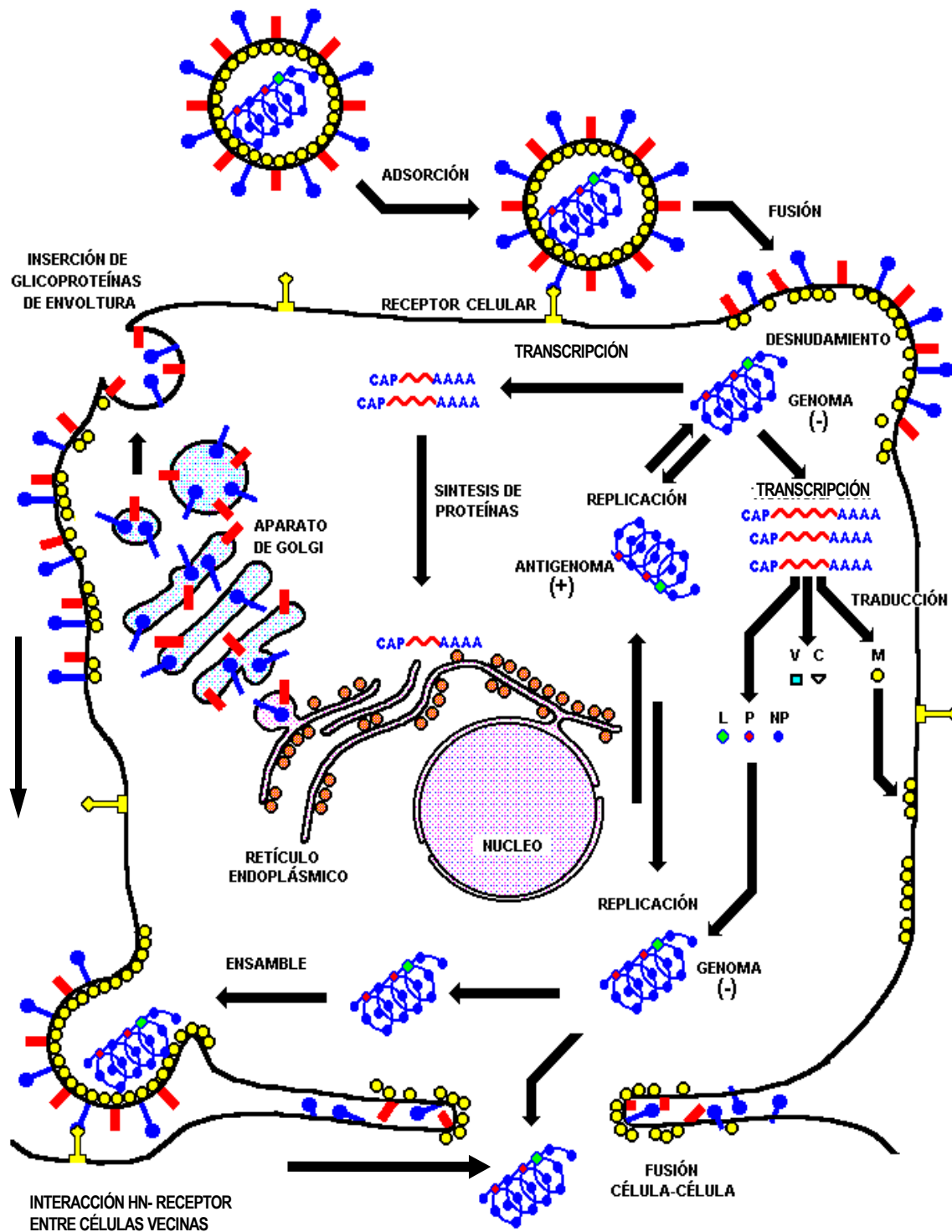


Figura 2. Ciclo biológico de los rubulavirus. Los detalles se explican en el texto. Esquema modificado de la Ref. (1).

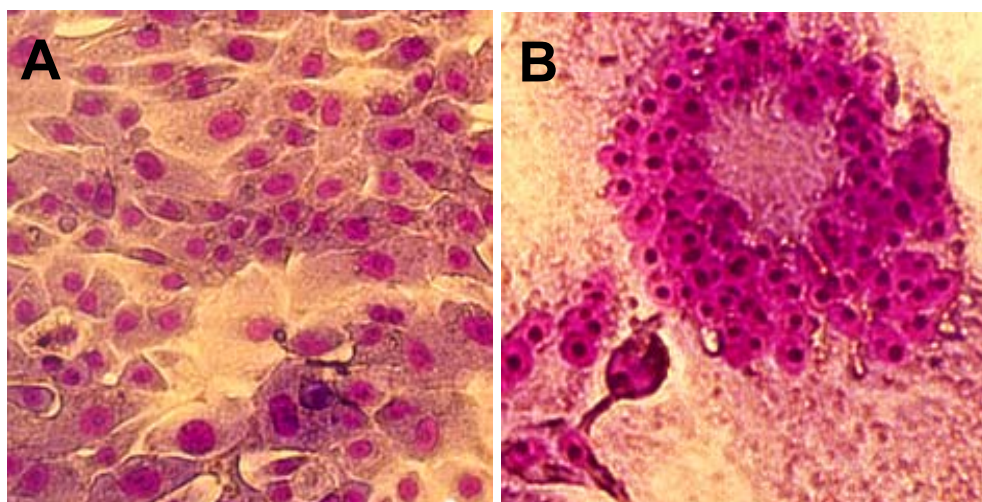


Figura 3. Efecto citopático producido por el *Rubulavirus porcino* en células de riñón de mono verde africano Vero. En los cultivos no infectados se observa una monocapa celular confluyente (A). En los cultivos infectados se observa la formación de sincitios o células gigantes multinucleadas (B); nótese la aglomeración de núcleos dentro de un solo citoplasma resultado de la fusión de membranas.

La etiología de la enfermedad del ojo azul fue demostrada por Stephano y colaboradores, quienes aislaron un virus hemaglutinante con morfología similar a los paramixovirus, a partir del tejido cerebral de lechones. Este virus denominado paramixovirus del ojo azul (POA), reprodujo el característico cuadro de lesiones neurológicas y respiratorias con opacidad corneal en cerdos lactantes menores de 20 días de edad, infectados por vía intranasal (21). Moreno-López y colaboradores reportaron el aislamiento de otro virus, a partir del cerebro de lechones con meningoencefalitis, al que llamaron virus de La Piedad, Michoacán (LPM). Este virus mostró actividades hemaglutinante, hemolítica, de neuraminidasa (sialidasa) y formadora de sincitios en cultivos celulares y reprodujo las alteraciones neurológicas en lechones y ratones infectados intracerebralmente (23). Al analizar sus propiedades demostraron también que los viriones contienen una nucleocápside helicoidal, constituida por ARN de cadena sencilla negativa, la cual está protegida por una membrana lipoproteica de origen celular. Análisis posteriores de las secuencias genéticas mostraron que el agente de la enfermedad del ojo azul presenta un elevado porcentaje de identidad en secuencias génicas y peptídicas con los virus de la parotiditis humana, de parainfluenza 2 y 4, de Newcastle aviar y el virus símico 5 (18,19), razón por la cual fue clasificado en el género *Rubulavirus* (4).

Cuadro 2. Identidad genética. El porcentaje de identidad entre los miembros del género *Rubulavirus* varía dependiendo de los genes analizados, por ejemplo el gen de la glicoproteína de adherencia (HN) muestra una identidad del 32-46%, un valor similar se observa en el gen de la proteína de matriz (M), 25-46%, pero puede ser mayor al 50% en el gen L. En la mayoría de los genes analizados, el rubulavirus porcino presenta los mayores porcentajes de identidad con el virus de la parotiditis humana.

Porcentaje de identidad genética de los Rubulavirus con otros Paramixovirus.

| | HN/H/G | M | L | P ² | V ² |
|--------------------------|--------|-------|-------|----------------|----------------|
| Rubulavirus ¹ | 32-46 | 25-46 | 33-76 | 31-43 | 49-60 |
| Respirovirus | 25-28 | 17-26 | 24-28 | <20 | <20 |
| Morbillivirus | 14-23 | 21-25 | 23-27 | <20 | <20 |
| Pneumovirus | 18-23 | 15-21 | 37-54 | ND | ND |

Porcentaje de identidad genética del Rubulavirus porcino con otros Rubulavirus.

| | HN | M | L | P ² | V ² |
|--------------------|----|----|------|----------------|----------------|
| V. Parotiditis | 41 | 46 | 56.3 | 43 | 60 |
| V. Símico 5 | 43 | 36 | 53.7 | 35 | 56 |
| V. Parainfluenza 2 | 38 | ND | 52.8 | 38 | 49 |
| V. Parainfluenza 4 | 35 | Nd | ND | 31 | 51 |
| V. Enf. Newcastle | 32 | 25 | 33.4 | ND | ND |

¹. Comparación entre miembros del mismo género. Datos obtenidos de las referencias 3, 4, 18, 19.

². Este valor corresponde sólo a las regiones conservadas de estas proteínas. ND no determinado.

Variantes clínicas en infecciones por rubulavirus.

Los primeros reportes de la enfermedad del ojo azul describieron esencialmente cuadros de meningoencefalitis en cerdos lactantes menores de 1 mes de edad; la morbilidad fue del 20% y la mortalidad cercana al 90%. Los cerdos de mayor edad presentaron una morbilidad del 1-4%, con una mortalidad casi nula; las hembras gestantes infectadas mostraron índices altos de infertilidad, con abortos y mortinatos, pero sin otros signos clínicos ni lesiones aparentes (21). La falta de signos clínicos en los cerdos machos adultos, hizo pensar que éstos eran refractarios a la infección. A partir de 1983, se incrementó notablemente la identificación de cerdos de 3-4 meses de edad con opacidad corneal y signos de lesión neurológica, como parálisis del tren posterior e incoordinación motriz. La morbilidad y mortalidad de los animales de estas edades aumentaron hasta alcanzar el 30 y 20%, respectivamente. Desde 1988, se identificaron brotes de la infección en granjas reproductoras, las cuales sufrieron un drástico incremento en los índices de

infertilidad, observándose cerdos adultos con opacidad corneal y con notables alteraciones respiratorias (22). También se identificaron signos de lesión en el aparato reproductor de los machos adultos, que consistieron en inflamación testicular y epididimaria, que en la mayoría de los casos condujo a atrofia testicular irreversible (24). Desde entonces los brotes de la enfermedad se presentan con todo el conjunto de alteraciones mencionadas: lesiones nerviosas en lechones y alteraciones reproductivas en hembras y machos adultos (22).

¿Cómo ingresa el virus al organismo?

En general, los paramixovirus se transmiten de un individuo a otro por vía aérea, por la aspiración de microgotas contaminadas con el virus. Cuando el tamaño de la gota es muy grande, ésta queda atrapada en la mucosa oronasal y el virus tiene que buscar una célula susceptible para replicarse; cuando las gotas son muy pequeñas, los virus ingresan con la inspiración hasta el interior del pulmón y se depositan en los conductos aéreos inferiores. De acuerdo con diversas evidencias experimentales, la multiplicación inicial del RVP se lleva a cabo en la mucosa nasofaríngea y el tejido linfático asociado; posteriormente el virus se disemina por vía aérea a los bronquios y pulmones donde se replica abundantemente. Al parecer, de ahí se disemina por vía sanguínea a todo el organismo (21, 25, 26). Durante la fase de viremia el virus se transporta asociado a eritrocitos y monocitos (27, 28), lo que le permite producir una infección sistémica y replicarse en sitios inmunoprivilegiados de órganos linfáticos y reproductores (27-29). El ingreso al sistema nervioso central parece ocurrir a través de las terminaciones del nervio olfatorio en la mucosa nasal, ya que el bulbo olfatorio y las vías de conducción del estímulo olfatorio son las primeras en mostrar reacción positiva en las pruebas de detección del antígeno viral. De ahí, el virus se disemina al hipocampo, tallo cerebral y cerebelo donde se replica abundantemente (25, 26). Aunque se propone también que el virus ingresa al SNC por vía sanguínea, atravesando la barrera hematoencefálica (25).

¿Qué determina la susceptibilidad celular?

Cuando comenzamos a trabajar con el rubulavirus porcino nuestras ideas giraban entorno a dos preguntas esenciales: ¿por qué el virus infecta cerdos lactantes y no infecta cerdos adultos? y ¿qué factores determinan que un animal sea susceptible a la infección?. Ya que la susceptibilidad a las infecciones virales es determinada por la expresión de receptores celulares, lo primero que hicimos fue identificar el tipo de moléculas que el virus estaba utilizando como receptor.³ Sabíamos que los Paramixovirus tenían un rango estrecho de hospederos, que en general las infecciones por estos virus se manifestaban en animales jóvenes y que una buena parte de ellos utilizaban carbohidratos como

³ Un receptor es una molécula de la superficie celular que es reconocida en forma específica por un virus y que le permite adherirse a la membrana e infectar a la célula.

receptores. Así, propusimos la hipótesis de que la susceptibilidad a la infección por rubulavirus porcino estaba determinada por el reconocimiento de algún tipo de carbohidrato que sólo se expresaba en cerdos lactantes. Para probar esta hipótesis, trabajamos sobre la hemaglutinación, la propiedad que tienen los virus de unirse a eritrocitos y agruparlos *in vitro*. La primera serie de experimentos consistió en incubar al virus con diversos azúcares una hora antes de añadir los eritrocitos, para encontrar aquellas moléculas que simulando la estructura del receptor evitaban la hemaglutinación. De esta manera determinamos que el RVP reconoce específicamente diversas moléculas que contienen ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), las cuales inhibieron su actividad hemaglutinante (30). Posteriormente, realizamos la purificación de la glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN), que es la responsable del reconocimiento del receptor celular, y determinamos que su especificidad estaba dirigida hacia el disacárido sialil α 2,3galactosa (Neu5Ac α 2,3Gal), componente terminal de diversas glicoproteínas celulares (31). Un dato importante fue que la HN no presentó reacción alguna con un isómero de este disacárido llamado sialil α 2,6galactosa (Tabla II),.

El siguiente paso fue demostrar que las células susceptibles al virus poseían ácido siálico y que este compuesto era necesario para que el virus infectara a las células. Con este fin utilizamos dos líneas celulares susceptibles a la infección por rubulavirus porcino, la línea PK15 (de riñón de cerdo) y la línea Vero (de riñón de mono verde africano). Al realizar los ensayos de competencia, en los cuales se incubaba al virus con diversos azúcares, encontramos que sólo los residuos de ácido siálico fueron capaces de evitar la infección viral en cultivos celulares. Entonces, realizamos experimentos para eliminar los receptores virales de la superficie celular utilizando enzimas. En una serie de experimentos eliminamos el ácido siálico de la superficie celular, mediante tratamiento con las enzimas

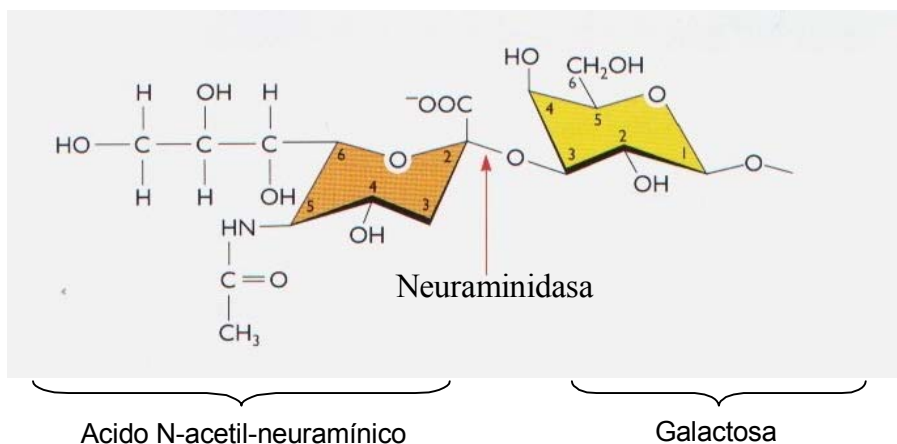


Figura 4. Estructura del disacárido sialil α 2,3galactosa. Esta molécula está formada por un residuo de ácido N-acetil-neuramínico unido en enlace glicosídico alfa al carbono 3 de la galactosa. Se muestra el sitio de corte de la enzima neuraminidasa. Los estudios indican que esta molécula es componente del receptor celular del rubulavirus porcino.

neuraminidasas obtenidas de *Vibrio cholerae* o de *Clostridium perfringens*. Esto convirtió en resistentes a las células que normalmente eran susceptibles a la infección por RVP. Curiosamente, cuando se utilizó tripsina (una enzima que corta proteínas), la infección se incrementó notablemente, sugiriendo que el virus no interactúa directamente con proteínas y que las porciones peptídicas, eliminadas por la tripsina, estaban encubriendo residuos de ácido siálico, que después del tratamiento enzimático fueron reconocidos por el virus (30).

Para confirmar que la susceptibilidad de los cultivos celulares a la infección por RVP fue determinada por la expresión del disacárido Neu5Ac α 2,3Gal realizamos una serie de

Tabla II. Ensayos de competencia utilizando azúcares y glicoproteínas para inhibir la actividad hemaglutinante del *Rubulavirus porcino*

| Compuesto | Concentración (μ M) ¹ | Potencia Inhibitoria ² |
|---|---------------------------------------|-----------------------------------|
| N-glicolil-neuramínico | 200 | 1 |
| N-acetil-neuramínico (Neu5Ac) | 100 | 2 |
| Neu5Ac-4-O-acetilado | 100 | 2 |
| Neu5Ac-9-O-acetilado | 100 | 2 |
| Neu5Ac α -metil-glicósido | 6.0 | 33.2 |
| Neu5Ac β -metil-glicósido | 200 | NI |
| Neu5Ac α 2,3Galactosa | 12.5 | 16 |
| Neu5Ac α 2,6Galactosa | 200 | NI |
| Ác. polisiálico (Neu5Ac α 2,8Neu5Ac) | 100 ³ | 1 |
| Glicoproteína- α ₁ -ácida | 0.1 | 2,000 |
| Glicoproteína- α ₁ -ácida desializada | 10 | NI |
| IgA sérica humana | 0.05 | 4,000 |
| IgA sérica humana desializada | 10 | NI |

Otros azúcares que no inhibieron a 200 mM fueron L- y D-fucosa, D-manosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, D-glucosa, D-galactosa, D-galactosamina, D-glucosamina, D-manosamina, melezitosa, lactosa, rafinosa. Las siguientes glicoproteínas no inhibieron a una concentración máxima de 10 μ g/ml: fetuina, fetuina desializada, ovoalbúmina, IgG e IgM humanas, mucina submaxilar ovina y bovina. Datos tomados de una publicación previa (31).

¹ Concentración mínima para inhibir 4 unidades hemaglutinantes de la proteína HN.

² La potencia inhibitoria es el valor comparativo con la concentración inhibitoria del ácido N-glicolil-neuramínico.

³ La concentración del ácido polisiálico corresponde a μ g/ml ya que no se conoce su peso molecular.

NI: no inhibición.

experimentos en los que se modificó la expresión de los oligosacáridos utilizando para ello los inhibidores de la glicosilación: tunicamicina, desoxinojirimicina y Desoximanojirimicina y el esteroide dexametasona. La tunicamicina inhibe la glicosilación de proteínas al competir con el transportador glicosídico dolicol pirofosfato; como resultado las proteínas no se glicosilan y se disminuye su expresión en la membrana. La desoxinojirimicina inhibe la acción de las enzimas glucosidasas I y II del retículo endoplásmico y la desoximanojirimicina inhibe a la manosidasa I del aparato de Golgi. En consecuencia el precursor glicosídico que fue asociado a la proteína recién sintetizada no es procesado, y como resultado se obtienen glicoproteínas con un alto contenido de manosas o con glicosilaciones incompletas, pudiendo o no alterarse la expresión de la proteína en la membrana. Por otra parte, la dexametasona induce modificaciones en la transcripción de diversos genes, y en relación a la glicosilación, induce un incremento en la expresión de la β -galactosil- α 2,6-sialiltransferasa, una enzima que aumenta la expresión en la superficie celular de ácido siálico unido en enlace $\alpha(2 \rightarrow 6)$ a galactosa (Neu5Ac α 2,6Gal), disminuyendo así, la expresión de su isómero Neu5Ac α 2,3Gal; todo esto sin afectar la expresión de la glicoproteína. Con estos experimentos confirmamos que la expresión de Neu5Ac α 2,3Gal es un requerimiento imprescindible para que ocurra la infección por RVP (Figura 5). En ese trabajo también realizamos ensayos de inmunohistoquímica con diversas lectinas (ver Cuadro III y Tabla III) para demostrar que la expresión de oligosacáridos celulares se había modificado después del tratamiento con los inhibidores de la glicosilación (32).

Cuadro 3. Lectinas. Son proteínas de origen vegetal, animal, bacteriano o viral que reconocen específicamente carbohidratos. Existen lectinas con actividad aglutinante sobre eritrocitos (hemaglutininas), leucocitos (leucoaglutininas), o con actividad mitogénica sobre diversas células (concanavalina A) o con actividad citotóxica (lectina de *Ricinus vulgaris*). La unión específica de las lectinas a azúcares determinados permite utilizarlas (en forma similar a los anticuerpos) como reactivos de reconocimiento en técnicas inmunohistoquímicas. En los ensayos mostrados en la tabla III, se utilizaron dos lectinas que reconocen ácidos siálicos: la aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA), que reconoce al ácido siálico cuando está unido por un enlace $\alpha(2 \rightarrow 3)$ con una galactosa y la aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) que reconoce al ácido siálico cuando está unido por un enlace $\alpha(2 \rightarrow 6)$ a galactosa o a N-acetil-galactosamina.

Tabla III. Ensayos de inmunohistoquímica con lectinas en células Vero

| <u>Lectinas</u> | | <u>MAA</u> | <u>SNA</u> |
|----------------------|--------------------|---------------|---------------|
| Azúcar reconocido | | Neu5Aca2,3Gal | Neu5Aca2,6Gal |
| Células normales | | +++ | + |
| Tunicamicina | 2 $\mu\text{g/ml}$ | - | - |
| Desoxinojirimicina | 5 $\mu\text{g/ml}$ | + | - |
| Desoximanojirimicina | 5 $\mu\text{g/ml}$ | ++ | + |
| Dexametasona | 5 μM | + | +++ |

Efectos de diferentes inhibidores de la glicosilación sobre la expresión de ácidos siálicos reconocidos por las lectinas de *Maackia amurensis* (MAA) y *Sambucus nigra* (SNA). Datos tomados de una publicación previa (32).

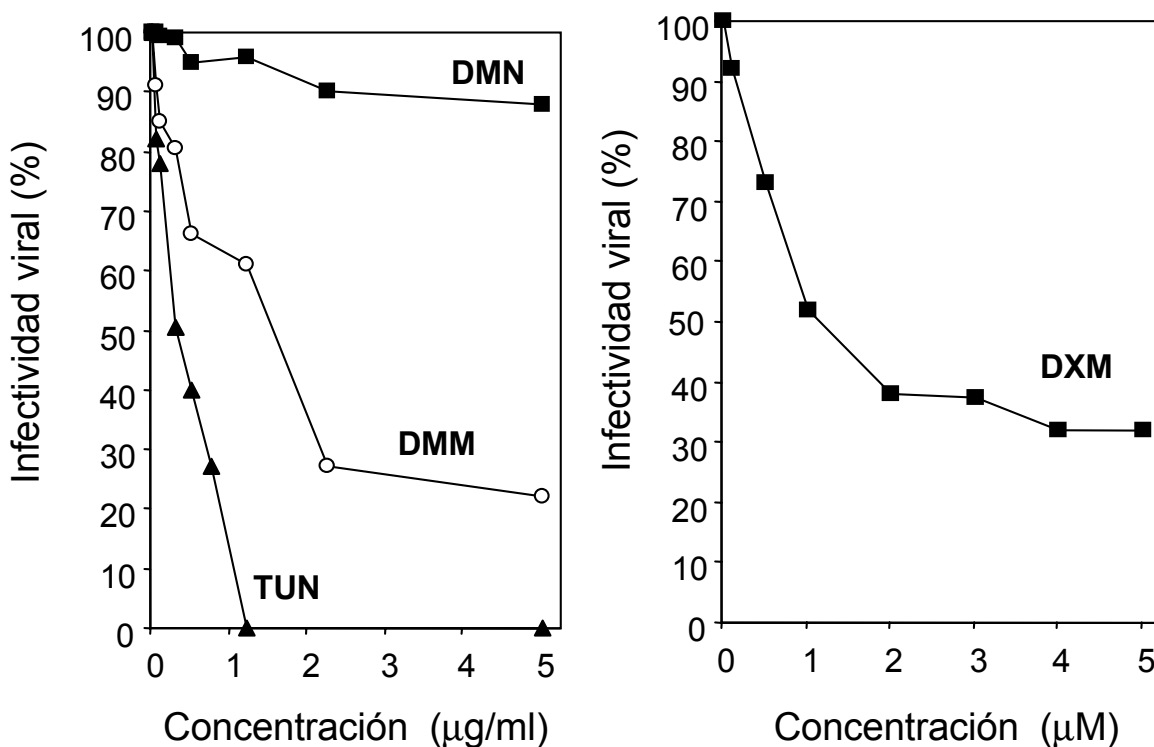


Figura 5. Modificaciones a la glicosilación de células de riñón de mono verde Vero. En A, se observan los efectos sobre la infección viral en células tratadas con los inhibidores de la glicosilación: tunicamicina (TUN), desoxinojirimicina (DNM) y desoximanojirimicina (DMM). En B, se muestran células tratadas con dexametasona (DXM), la que incrementa la expresión de la β -galactosil- α 2,6-sialiltransferasa. Ver detalles en el texto. Figuras extraídas de una publicación previa (32).

¿La expresión de receptores virales es determinante del tropismo tisular?

Recientemente nuestro grupo demostró que las moléculas de ácido neuramínico juegan un papel primordial en el tropismo tisular manifestado por el *Rubulavirus porcino*, ya que se identificó una correlación directa entre la expresión de Neu5Ac α 2,3Gal en un tejido sano y la detección de antígeno viral en los animales infectados (Tabla IV). En el SNC de cerdos neonatos la mayor expresión de Neu5Ac α 2,3Gal se localizó en cerebelo, médula oblonga y tálamo, así como en las estructuras involucradas en la conducción del estímulo olfatorio: nervio, bulbo y tracto olfatorio, corteza del lóbulo piriforme e hipocampo. En contraste, se observó que estas mismas estructuras del SNC de cerdos adultos casi no poseen Neu5Ac α 2,3Gal y en cambio, expresan abundantemente su isómero Neu5Ac α 2,6Gal, aumentando también la expresión de ácidos siálicos 9-O-acetilados. Además, al analizar cortes histológicos del sistema reproductor, se encontró que los residuos de Neu5Ac α 2,3Gal son más abundantes en testículos y epidídimo de cerdos adultos que en cerdos neonatos (33). Estos resultados indican que el tropismo tisular y la susceptibilidad a la infección viral son determinados por la expresión de Neu5Ac α 2,3Gal en un tejido. En el caso de los cerdos adultos, al parecer la falta de Neu5Ac α 2,3Gal en las terminaciones sensoriales de la mucosa olfatoria no permite la adsorción del rubulavirus a las células nerviosas, debido a que la glicoproteína HN del virus no interactúa con las moléculas de Neu5Ac α 2,6Gal (31), esto evita el paso del virus de la cavidad nasal hacia el tejido encefálico. Aunado a esto, la presencia de ácidos siálicos 9-O-acetilados, resistentes a la actividad neuraminidasa del virus (35,36), tal vez evita que se eliminen los ácidos siálicos que interfieren con el proceso de fusión de las membranas viral y celular, por lo que el virus no logra penetrar a las células nerviosas adultas. En conjunto los resultados anteriores indican que la molécula Neu5Ac α 2,3Gal (Figura 4) es el componente primordial del receptor celular del *Rubulavirus porcino* y que los cambios en su expresión determinan la susceptibilidad o resistencia de un tejido a la infección viral.

Variantes patogénicas y virulentas del *Rubulavirus porcino*.

Ramírez y colaboradores, en la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM, realizaron el aislamiento de rubulavirus en diversos brotes de la enfermedad del ojo azul. Estos virus han sido denominados POA-2 (Puebla/1988), PAC1 (Michoacán/1990), PAC2 (Jalisco/1990), PAC3 (Jalisco/1992), PAC4 (Michoacán/1993) y PAC5 (Texcoco/1994).

Tabla IV. Identificación de ácidos siálicos y antígeno viral en tejidos porcinos

| Antígeno Ac. Siálico Reconocido | Neonatos | | Adultos | | | |
|------------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | RVP ¹ | NeuAc | NeuAc | RVP ² | NeuAc | NeuAc |
| | | α 2,3Gal | α 2,6Gal | | α 2,3Gal | α 2,6Gal |
| Sistema Nervioso Central | | | | | | |
| Bulbo olfatorio | +++ | 3 | 0 | - | 0 | 3 |
| Corteza lóbulo piriforme | +++ | 3 | 0 | - | 0 | 2 |
| Corteza cerebral | + | 3 | 0 | - | 2 | 3 |
| Hipocampo | ++ | 2 | 1 | - | 2 | 3 |
| Tálamo | ++ | 3 | 1 | - | 1 | 2 |
| Tallo cerebral | +++ | 1 | 2 | - | 1 | 2 |
| Cerebelo | ++ | 2 | 2 | - | 1 | 3 |
| Sistema Respiratorio | | | | | | |
| Mucosa nasal | +++ | 3 | 3 | ++ | 3 | 2 |
| Tráquea | ++ | 2 | 2 | ++ | 2 | 2 |
| Bronquios | +++ | 2 | 2 | +++ | 2 | 2 |
| Pulmón | +++ | 3 | 2 | +++ | 3 | 2 |
| Aparato reproductor | | | | | | |
| Testículos | - | 2 | 2 | ++ | 3 | 2 |
| Epidídimo | - | 1 | 0 | +++ | 3 | 1 |
| Sistema linfático | | | | | | |
| Amígdalas | +++ | 3 | 2 | ++ | 3 | 2 |
| Nódulos linfáticos | + | 1 | 1 | +++ | 3 | 3 |

La histoquímica en cortes de tejidos porcinos fue realizada utilizando lectinas conjugadas a biotina y técnicas de amplificación con biotil-tiramida (33). Las lectinas y su especificidad por azúcares fueron *Maackia amurensis* (MAA, Neu5Ac α 2,3Gal) y *Sambucus nigra* (SNA, Neu5Ac α 2,6Gal). La unión de las lectinas fue evaluada como sigue: 0, ausente; 1, baja reacción observada en células dispersas; 2, mediana reacción, presente en menos de la mitad del corte histológico y 3, alta intensidad, observada homogéneamente en todo un tejido. En la identificación de antígeno o aislamiento viral (RVP): +, indica raramente encontrado; ++, regularmente encontrado; +++, encontrado frecuentemente y en abundancia. Tabla elaborada en base a los datos publicados en (33).

¹ En cerdos neonatos infectados con las cepas LPM, POA o PAC3 (ref. 20,25,34).

² En cerdos adultos infectados con la cepa PAC3 (Ref. 27,29,34).

ND: no determinado.

El estudio de las historias clínicas y los datos patológicos relacionados con cada aislamiento, permitió definir tres grupos virales de acuerdo a las alteraciones observadas y a la edad de la población más afectada. En el primer grupo quedan los virus LPM, POA y POA-2, con alteraciones neurológicas presentadas exclusivamente en lechones; en el segundo grupo los virus PAC1, PAC4, y PAC5, con alteraciones neurológicas y alta mortalidad en lechones, presentación de alteraciones neurológicas en cerdos de 3-4 meses y reproductivas en los machos adultos; y en el tercer grupo los virus PAC2 y PAC3, como causantes de problemas reproductivos en adultos y manifestaciones neurológicas escasas en los lechones (Tabla V). Todos los virus aislados hasta ahora producen un cuadro similar de alteraciones respiratorias y nerviosas en cerdos neonatos infectados experimentalmente. Sin embargo, los virus PAC1, PAC4 y PAC5 son más virulentos ya que fueron aislados de brotes de la enfermedad con alta mortalidad y el virus PAC1 produjo la muerte de lechones infectados experimentalmente en menos días que los virus LPM, POA y PAC3 (34).

Estudio de la variabilidad viral.

Al conocer la existencia de variantes del Rubulavirus porcino decidimos estudiar sus propiedades para buscar factores inherentes a cada virus que pudieran explicar los cambios en las características patológicas descritas.

Al realizar un seguimiento de la infección de cultivos celulares con las cepas LPM, PAC1 y PAC3, pertenecientes a cada una de las variantes patogénicas del *Rubulavirus porcino*, observamos que el virus PAC3 emerge de la célula hospedera antes que las otras dos cepas. Este virus además mostró mayor actividad enzimática y un nivel elevado de destrucción celular (citólisis). En este aspecto parece ser que, por lo menos *in vitro*, la cepa PAC3 es más virulenta que las otras dos, es liberada más rápidamente de la célula y probablemente por ello puede dispersarse con mayor facilidad en busca de otras células (35). Sin embargo, ensayos simultáneos de hemaglutinación, hemoelución y hemólisis, que indican respectivamente el grado de reconocimiento y adherencia al receptor celular, la eliminación del receptor celular (por la actividad neuraminidasa) y la capacidad de fusión y penetración celular, confirmaron que la cepa PAC3 posee mayor actividad neuraminidasa que la cepa LPM, pero también mostraron que la cepa PAC1 (al igual que las cepas PAC4 y PAC5) poseen una elevada actividad hemolítica, reflejo de la actividad de su proteína de fusión. Esto sugiere que la mayor virulencia *in vivo* de las nuevas cepas virales está más asociada a la proteína de fusión que a la proteína de adherencia y que el efecto citolítico observado *in vitro* en la cepa PAC3 está asociado con la actividad neuraminidasa que le permite al virus liberarse de la célula.

Tabla V. Alteraciones presentadas en los brotes de *Rubulavirus porcino*.

| Sistema afectado ¹ | Grupo 1 | | | Grupo 2 | | | Grupo 3 | |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | POA ² | LPM ³ | POA-2 | PAC1 | PAC4 | PAC5 | PAC2 | PAC3 |
| | Michoacán 1980 | Michoacán 1984 | Puebla 1988 | Michoacán 1990 | Michoacán 1993 | Texcoco 1994 | Jalisco 1990 | Jalisco 1992 |
| <u>Lactantes⁴</u> | | | | | | | | |
| Nervioso | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + |
| Respiratorio | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + |
| <u>3-4 meses</u> | | | | | | | | |
| Nervioso | - | - | - | ++ | ++ | ++ | - | - |
| Respiratorio | + | + | + | ++ | ++ | + | - | - |
| <u>Adultos⁵</u> | | | | | | | | |
| Nervioso | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Respiratorio | - | - | - | + | + | + | - | - |
| <u>Reproductor</u> | | | | | | | | |
| Masculino | - | - | - | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Femenino | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ |

+ significa que el signo fue observado. ++ significa que el signo se presentó en abundancia, - significa que el signo no fue observado.

¹ Conjunto de signos clínicos observados durante el aislamiento de cada cepa viral, los detalles clínicos se dan en el texto.

² Datos publicados (Ref. 20)

³ El virus LPM fue aislado de la misma zona donde se aisló el POA, pero no se tienen los datos clínicos exactos de la granja donde se presentó el brote por este virus.

⁴ Cerdos menores de 1 mes de edad.

⁵ En este trabajo se consideran cerdos adultos a animales de más de 9 meses de edad que son maduros sexualmente.

Nuestros estudios se centraron entonces en la glicoproteína HN, responsable del reconocimiento de receptores celulares y de la actividad neuraminidasa. Para esto se realizó la purificación de una forma activa de esta proteína en las cepas LPM, PAC1 y PAC3; y se realizaron ensayos de hemaglutinación y de competencia con azúcares. Aunque la proteína HN del virus PAC3 mostró una actividad hemaglutinante 1.5 y 2 veces más alta que los virus PAC1 y LPM, los ensayos de competencia realizados mostraron que las tres cepas tenían la misma especificidad, es decir, que todas reconocen residuos de ácido siálico unido en enlace α 2,3 a galactosa (35). Algún otro factor debería estar involucrado en los cambios en la patogenicidad y virulencia viral.

Al estudiar la actividad enzimática de la glicoproteína HN, encontramos que la cepa PAC3 presentaba 2 y 3 veces más actividad de neuraminidasa (V_{max}) que PAC1 y LPM, respectivamente. Sin embargo, la afinidad por los sustratos (K_m) fue similar y la especificidad por sialil(α 2,3)lactosa y una proteína sialilada, fetuína, fue la misma en las tres cepas. Ninguna de las neuraminidasas hidrolizó los azúcares sialil(α 2,6)lactosa, ni la caseína equina que tiene un alto contenido de ácidos neuramínicos O-acetilados (36).

¿Es la neuraminidasa un factor de virulencia?

En estudios realizados con el virus de influenza humana tipo A, cuyas propiedades biológicas son similares a las de los rubulavirus, se ha observado que una mutante con baja actividad de neuraminidasa produce en ratones una infección más benigna que la observada con la cepa silvestre, la cual posee una actividad enzimática mayor (37). Estos datos sugieren que la neuraminidasa podría jugar un papel en la virulencia de estos virus. Se ha postulado que una de las funciones de la neuraminidasa es la de favorecer la salida de los viriones de la célula (38-40), así como evitar la autoagregación de los mismos cuando han sido liberados al exterior (1, 41). Respecto de la primera propuesta, un virión con baja actividad de neuraminidasa se quedaría anclado en la membrana celular mucho más tiempo que un virión con una mayor actividad enzimática. Esto último puede ser extrapolado a la infección de cultivos celulares con las cepas del *Rubulavirus porcino*. Si consideramos que el virus PAC3 posee mayor actividad enzimática, sería lógico pensar que será liberado al medio antes que las otras dos cepas. En apoyo a esto se ha detectado la liberación del virus PAC3 a partir de las 12 horas pos-inoculación (hpi), mientras que las otras dos cepas tardan más de 24 h en ser identificadas en el medio de cultivo de las células infectadas. Un indicio más de la rápida liberación de los viriones es la lisis celular que se presenta en las células infectadas con PAC3, incluso antes de que se puedan observar sincitios. Esto sucede igualmente a las 12 hpi y se va incrementando con el transcurso de la infección, llegando a una lisis total del cultivo a las 72 hpi, mucho antes que las otras dos cepas (35). Estos datos sugieren que el virus, al ser liberado más fácilmente de la célula, puede migrar a otros sitios y provocar una infección más diseminada, aunque no necesariamente con mayor potencial de daño a los tejidos, como ocurre en los animales infectados por el virus PAC3.

Por otro lado, se ha reportado que un virus con baja actividad de neuraminidasa, se puede diseminar de célula a célula por el proceso de fusión de membranas, mientras que un virus con mayor actividad de neuraminidasa no se disemina de esta manera porque la misma enzima degrada al receptor en la célula vecina y no pueden fusionarse sus membranas. Esto apoya nuestros resultados, ya que los virus con menor actividad enzimática LPM y PAC1, producen mayor número de sincitios. Extrapolando a manera de hipótesis a la infección en el organismo, un virus con baja actividad de neuraminidasa podría tener el tiempo suficiente para adherirse a la mucosa nasal y pasar por fusión al SNC, como lo hace el virus LPM. La combinación de un gran potencial fusionante y enzimático en el virus PAC1, tal vez sea responsable del incremento en la virulencia de esta cepa, que no sólo daña más el SNC de cerdos neonatos, sino que logra infectar

también el SNC de cerdos de 3-4 meses de edad (33). Por su parte el virus PAC3 tiene una actividad enzimática tan alta (y una actividad fusionante tan baja) que no siempre puede permanecer adherido al epitelio de la mucosa nasal el tiempo suficiente para asegurar una infección eficiente en la mucosa olfatoria y de ahí pasar al SNC, por lo que es arrastrado por la corriente aérea hacia otros sitios para producir una infección sistémica.

¿Puede la neuraminidasa inducir muerte celular?

De acuerdo con nuevos hallazgos en el virus de la influenza A, la neuraminidasa es un factor esencial en el daño que se presenta en las células infectadas, ya que comparando dos cepas distintas, se observó que la cepa con mayor actividad indujo en cultivos celulares un mayor número de células apoptóticas. Dicho proceso parece ser desencadenado por la eliminación de un residuo de ácido siálico en el factor de crecimiento tumoral β (FCT β), lo que activa una serie de eventos que culminan con la lisis celular a través de apoptosis. Un evento similar ocurre en linfocitos: ciertas neuraminidasas, al eliminar los residuos de ácido siálico, exponen residuos de galactosa que son reconocidos por galectinas transmembranales que inducen una cascada de señales que culminan en apoptosis. Estos datos son importantes porque sugieren que el mayor daño a las células, observado en la infección de cultivos celulares con el virus PAC3, no es causado esencialmente por la replicación viral sino por el proceso apoptótico, desencadenado entre otros factores, por la neuraminidasa viral (42, 43).

¿Cómo responde el organismo a la infección viral?

Como mencionamos al principio de este trabajo, la patogenia viral no sólo abarca el estudio del daño ocasionado directamente por la replicación viral. También debe incluir la participación de la respuesta inmune en el establecimiento de un estado de resistencia a la infección, su participación en la producción de factores que controlen la diseminación y la replicación viral y el papel que juegue esta respuesta en la generación del daño a los tejidos.

Los anticuerpos y los linfocitos T son los principales sistemas efectores para resolver la infección viral. Los anticuerpos pueden reconocer virus en forma libre o células infectadas por virus. Ellos controlan las infecciones neutralizando las partículas virales o produciendo la muerte de las células infectadas a través del proceso de citotoxicidad mediada por anticuerpos realizada por el sistema del complemento o por células citotóxicas. Las proteínas importantes en estos procesos son las proteínas de la superficie viral y aunque se producen anticuerpos contra componentes internos del virión, éstos no son importantes en la neutralización de la infección. Cambios en la estructura o en la expresión de las proteínas de superficie pueden ser mecanismos importantes mediante los cuales los virus evaden el reconocimiento y la eliminación por anticuerpos.

En contraste con los anticuerpos, los linfocitos T sólo pueden reconocer al antígeno en asociación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), que se expresan en la superficie de macrófagos y otras células especializadas en la presentación de antígenos. Una importante consecuencia de este modo de reconocimiento es que los linfocitos T no pueden reconocer virus libres, y su actividad antiviral está confinada a las células infectadas. El mecanismo primario utilizado por los linfocitos T CD8+ para controlar la infección viral es eliminar a las células infectadas. Las células CD8+ también controlan el crecimiento viral produciendo citocinas antivirales como el interferón gamma y el factor de necrosis tumoral, que interfieren con la replicación viral. Los linfocitos T CD4+ juegan un papel central en la inmunidad antiviral pues participan en el control de la infección por medio de diversos mecanismos. Ellos producen proteínas con actividad antiviral, están involucrados en la activación y reclutamiento de macrófagos y ayudan, mediante la síntesis de citocinas, en la producción de anticuerpos y en la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8+ (44).

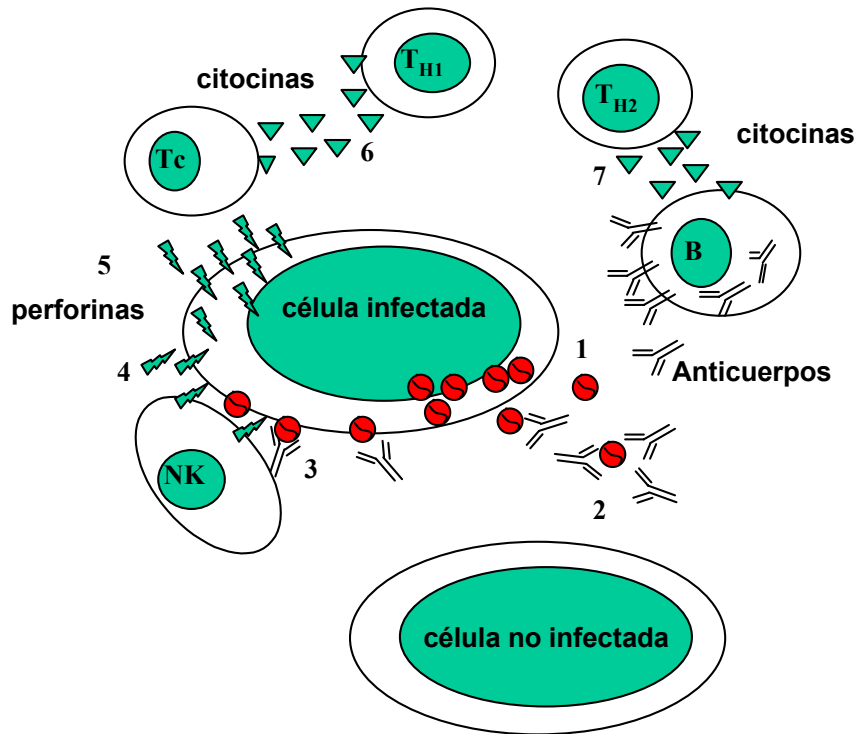
La respuesta humoral contra el *Rubulavirus porcino* se inicia con la producción de anticuerpos desde la primera semana posinfección. Durante las primeras 4 semanas los títulos se incrementan entre 4 y 6 log₂ (unidades logarítmicas en base 2) y a partir de la quinta semana llegan a incrementarse hasta 8.5 unidades logarítmicas (28). En la infección natural se han encontrado anticuerpos hasta 18 meses después de presentados los signos clínicos de la enfermedad (21). La inmunidad humoral es de gran importancia en el control de la diseminación sistémica de la infección ya que títulos elevados de anticuerpos coinciden con la desaparición de la viremia (27). Los anticuerpos generados están dirigidos principalmente contra la proteína HN y son capaces de inhibir la hemaglutinación y neutralizar la infección viral (28). Los anticuerpos contra el *Rubulavirus porcino* pueden ser inducidos utilizando como antígeno virus inactivado con formalina y esta inmunidad puede transmitirse de la madre a los hijos al vacunar a cerdas en gestación. Los anticuerpos adquiridos pasivamente de la madre, a través de la placenta o al consumir el calostro y la leche, logran controlar la infección y reducir los índices de morbilidad y mortalidad en los lechones nacidos de cerdas vacunadas (45). Ensayos *in vitro* muestran que los anticuerpos específicos contra el *Rubulavirus porcino* o contra determinantes antigénicos de la proteína HN poseen actividad neutralizante (46). No obstante estos resultados alentadores, hasta el momento no se ha logrado producir una vacuna que sea lo suficientemente efectiva para controlar la infección en el campo. Al respecto, en el laboratorio hemos encontrado que las diferentes cepas del rubulavirus que circulan en la población porcina poseen diferencias antigénicas (Figura 6) que les permiten evadir la respuesta inducida por algún otro serotipo viral (34).

El primer cambio que se observa en la respuesta inmune celular después de la infección con *Rubulavirus porcino* es un aumento en el número de linfocitos T citotóxicos (CD8+). Esto ocurre durante la primera semana, demostrando la importancia de estas células en el control de la infección. Un evento intrigante es una notable reducción en el número de linfocitos CD4+ que ocurre en la tercera semana posinfección. Este fenómeno puede estar ligado a dos eventos: por un lado, las células específicas para antígenos virales son reclutadas a los tejidos infectados para participar en el control de la infección.

Esto es sugerido por la abundancia de linfocitos y monocitos observados en los tejidos infectados (29). Por otra parte, se ha demostrado que los linfocitos CD4+ estimulados por el virus se transforman en linfocitos CD4+CD8+. Los estudios realizados demuestran que esta población de linfocitos T responden de manera específica al virus para convertirse en células de memoria productoras de citocinas de tipo 2 (principalmente interleucina 10), las

Cuadro 4. Respuesta Inmune Antiviral. El sistema inmune está formado por diferentes tipos de linfocitos que participan en el control de la infección viral. **Los linfocitos B** se especializan en la producción de inmunoglobulinas o anticuerpos que al reconocer a los virus libres (1) evitan que se adhieran a la célula y por lo tanto neutralizan la infección viral (2). Al reconocer antígenos virales en las superficies de células infectadas (3), promueven la actividad citolítica (4) de células asesinas naturales (NK, natural killers). **Los linfocitos T** se encargan de la inmunidad mediada por células y se dividen en linfocitos T cooperadores (CD4+ o T_H) y linfocitos T citotóxicos (CD8+ o T_C). **Los linfocitos T_C CD8+** producen sustancias citotóxicas (**perforinas**) que destruyen la membrana de las células infectadas por virus (5). **Los linfocitos T_H CD4+** organizan las actividades de las demás células inmunes para producir una respuesta inmune adecuada a cada antígeno; esto lo logran mediante la liberación de mediadores químicos llamados **citocinas**, que modifican el estado de actividad de las otras células. A su vez los linfocitos T CD4+ se subdividen en **Linfocitos T_{H1} (cooperadores 1)** y **T_{H2} (cooperadores 2)**:

los primeros inducen respuestas de tipo citotóxico (6), mientras que los segundos inducen respuestas mediadas por anticuerpos (7). En el cerdo se ha identificado la abundancia de una población de **linfocitos T CD4+CD8+** (muy escasos en el ser humano) que participa en la generación de memoria inmunológica contra virus y que, en el caso del *Rubulavirus porcino* se comportan como linfocitos T_{H2}.



cuales inducen una respuesta inmune mediada por anticuerpos (47,48). Éste tal vez sea un mecanismo inducido por los rubulavirus para modular la respuesta antiviral y sobrevivir en el hospedero evitando la actividad citolítica de los linfocitos T.

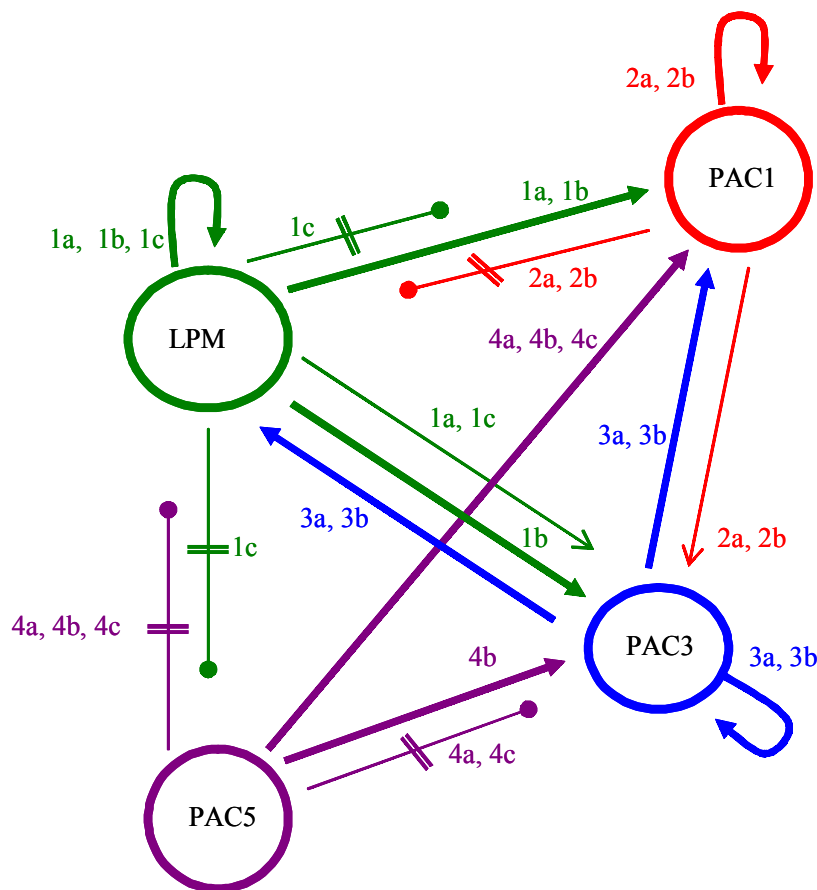


Figura 6. Reacciones antigénicas cruzadas entre cepas del *Rubulavirus porcino*. Este esquema es un compendio de diversos ensayos, los anticuerpos utilizados fueron: 1a: suero de cerdo infectado experimentalmente con virus LPM. 1b: suero hiperinmune de conejo anti- LPM. 1c: suero hiperinmune de conejo contra la proteína HN del virus LPM. 2a: suero de cerdo infectado experimentalmente con PAC1. 2b: suero de cerdo infectado naturalmente con PAC1. 3a: suero hiperinmune de conejo anti-PAC3. 3b: suero de cerdo infectado naturalmente con PAC3. 4a, 4b y 4c: suero de tres diferentes cerdos infectados naturalmente con PAC5. Una flecha ancha indica una reacción intensa de reconocimiento. Una flecha delgada indica una reacción antigénica débil. Una flecha troncada con cabeza redondeada indica falta de reconocimiento.

La importancia de la respuesta inmune celular en el control de la infección viral fue evaluada midiendo la capacidad proliferativa de células inmunes en respuesta al antígeno viral y a los mitógenos concanavalina A y fitohemaglutinina. Una fase de inmunosupresión

pasajera fue identificada en los animales infectados, representada por índices de proliferación muy bajos con los dos mitógenos (28). Esta inmunosupresión puede ser la razón de que se haya descrito un incremento en la susceptibilidad a padecer infecciones secundarias en los animales infectados con *Rubulavirus porcino* (20). El análisis de los valores de los diferentes tipos de leucocitos en los animales infectados mostró que durante la tercera semana de la infección se presenta una disminución del 19% de linfocitos T, de 28% de linfocitos B y de 53% de monocitos en comparación con los valores promedios observados en los animales sanos utilizados como testigos (28). Esta disminución puede ser resultado de la infección de células sanguíneas que hemos identificado durante la fase de viremia que se presenta entre los días 14 y 21 pos-infección (27). La identificación de antígeno viral, en el interior de células mononucleares circulantes y en células inmunes de nódulos linfáticos, indica que el mismo sistema inmune es blanco de la infección viral, aunque no se presente una notable alteración en los mecanismos de respuesta como ocurre en virus verdaderamente inmunosupresores.

Inmunopatología

Hasta el momento no se han realizado experimentos para conocer la participación del sistema inmune en el daño a los tejidos durante la infección por *Rubulavirus porcino*. No obstante, observaciones indirectas indican que la respuesta inmune está involucrada al menos en dos eventos patológicos. Stephano ha propuesto que la opacidad de la córnea es una reacción de hipersensibilidad mediada por complejos inmunes (20). La gran respuesta de anticuerpos circulantes contra el *Rubulavirus porcino* observada en las infecciones experimentales y la identificación de una abundante expresión de receptores virales en el tejido ocular hacen suponer que efectivamente hay una deposición de complejos inmunes en la cámara anterior del ojo, lo que produce la opacidad corneal. El otro evento es la formación del granuloma epididimario que se presenta en los cerdos adultos. Al parecer el virus llega al epidídimo transportado por células inmunes que infiltran el tejido, la abundante replicación viral en ese sitio y en los conductos seminíferos atraen una gran cantidad de células inmunes: monocitos, linfocitos T y células plasmáticas, que en su afán por destruir las células infectadas, terminan por dañar las paredes de los conductos, dejando escapar a los espermatozoides al tejido intersticial, lo que genera un círculo vicioso de activación de células fagocíticas y citotóxicas que incrementan el daño a los tejidos circundantes. El granuloma que se forma produce un engrandecimiento testicular anormal, y el daño al tejido puede ser tan importante que induzca la involución y la atrofia del testículo afectado (29).

Conclusiones.

La generación del daño a los tejidos durante la infección por *Rubulavirus porcino* involucra diversos factores moleculares. El virus posee componentes estructurales que causan daño directo a las células infectadas o que modulan la respuesta inmune con el fin de asegurar su supervivencia en el organismo. Esto induce una inmunosupresión

pasajera que favorece las infecciones secundarias y el debilitamiento orgánico. Por otra parte, los elementos de la respuesta inmune en su intento de controlar y eliminar la infección viral, producen daño a las células infectadas y a los tejidos vecinos no infectados. No hay duda que la hemaglutinina-neuraminidasa juega un papel decisivo en la susceptibilidad celular y en el tropismo tisular del virus. Nuestros estudios indican que la neuraminidasa es un probable factor de virulencia. No obstante, aun nos falta mucho por conocer sobre los procesos moleculares que participan en la patogénesis viral.

Referencias.

1. Lamb RA, Kolakofsky D (1996). *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*,. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM *et al.* (Eds). *Fields Virology*. Tercera Ed. Lippincott-Raven Publishers. Filadelfia-Nueva York, pp. 1177-1204.
2. Collier L, Oxford J (2000). Childhood infections caused by paramyxovirus. En: *Human Virology*. Segunda Ed. Oxford University Press. Nueva York. pp. 75-81.
3. Wolinsky JS (1996). Mumps virus. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM *et al.* (Eds). *Fields Virology*. Tercera Ed. Lippincott-Raven Publishers. Filadelfia-Nueva York. pp. 1243-1266.
4. Rima B, Alexander DJ, Billeter MA *et al.* (1995). Family *Paramyxoviridae*. En: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL *et al.* (Eds). *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses* Springer-Verlag. Viena Nueva York. pp. 265-274.
5. Pringle CR (1999). Virus taxonomy-1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Arch. Virol.* 144: 421-429.
6. Drake JW (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4171-4175.
7. Iorio RM, Borgman JB, Glickman RL, Bratt MA (1986). Genetic variation within a neutralizing domain on the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 67: 1393-1403.
8. Hetherington SV, Watson AS, Scroggs RA, Portner A (1994). Human parainfluenza virus type 1 combines cocirculation of strains and development of geographically restricted lineage. *J. Infect. Dis.* 169: 248-252.
9. Yates PJ, Afzal MA, Minor PD (1997). Antigenic and genetic variation of the HN protein of mumps virus strains. *J. Gen. Virol.* 77: 2491-2497.
10. Heinen E, Herbst W, Schmeer N (1998). Isolation of a cytopathogenic virus from a case of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and its characterization as a parainfluenza virus type 2. *Arch. Virol.* 143: 2233-2239.
11. Philbey AW, Kirkland PD, Ross AD, Davis RJ, Gleeson AB, Love RJ, Daniels PW, Gould (1998). An apparently new virus (family *Paramyxoviridae*) infectious for pigs, humans, and fruit bats. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 269-271.
12. Bowden TR, Westenbergh M, Wang LF, Eaton BT, Boyle DB (2001). Molecular characterization of Menangle virus, a novel paramyxovirus which infects pigs, fruit Bats, and humans. *Virology* 283: 358-373.

13. Chua KB, Bellini WJ, Rota PA *et al.* (2000). Nipah virus, a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288: 1432-1435.
14. Domingo E (1989). RNA virus evolution and the control of viral disease. *Prog. Drug Res.* 33: 93-133.
15. Mackenzie JS, Chua KB, Daniels PW *et al.* (2001). Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 497-504.
16. Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jáuregui P, Linné T, Moreno-López J (1990). The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J. Gen. Virol.* 71: 609-613.
17. Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J, Roux L (1998). Paramyxovirus RNA synthesis and requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J. Virol.* 72: 891-899.
18. Berg M, Hjertner B, Moreno-López J, Linné T (1992). The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polipeptides, P, V and C; the P protein mRNA is edited. *J. Gen. Virol.* 73:1195-1200.
19. Linné T, Berg M, Bergvall AC, Hjertner B, Moreno-Lopez J (1992). The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Vet. Microbiol.* 33: 263-273.
20. Hernández-Jáuregui P, Yacoub A, Kennedy S, Curran B, Téllez C, Svenda M, Ljung L, Moreno-López J (2001). Uptake of porcine rubulavirus (LPMV) by PK15 cells. *Arch. Med. Res.* 32: 400-409.
21. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC (1988). Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 122: 6-10.
22. Stephano A (2000). La enfermedad del ojo azul. Signos clínicos y lesiones. En: *Memorias del Simposium Internacional sobre Enfermedades Emergentes del Cerdo.* Irapuato, Gto. México. pp. 1-10.
23. Moreno-López J, Correa-Girón P, Martínez A, Ericsson A (1986). Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in México. *Arch. Virol.* 91: 221-231.
24. Campos HR, Carvajal SM (1989). Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. *Memorias de la XXVI Reunión Nacional de AMVEC, Manzanillo, Col.; México.* pp. 62-64.
25. Allan GM, McNeilly F, Walker Y, Linné T, Moreno-Lopez, Hernández-Jáuregui P, Kennedy S, Carrol BP, Herron B, Foster JC, Adair B (1996). A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: Immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 405-413.
26. Ramírez-Herrera MA, Mendoza-Magaña ML, Dueñas SH (1997). Experimental infection of swine and cat central nervous systems by the pig paramyxovirus of the blue eye disease. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]* 44: 461-476.
27. García O (1999). Estudio de la viremia en una infección experimental por *Rubulavirus porcino*. Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla.
28. Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez H, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E (1998). Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64: 367-381.
29. Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jáuregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S (1997). Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *J. Comp. Path.* 117: 237-252.

30. Reyes-Leyva J, Hernández-Jáuregui P, Montaña LF, Zenteno E (1993). The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl(α 2,3)galactose-containing structures. *Arch. Virol.* 133: 195-200.
31. Reyes-Leyva J, Espinosa B, Santos G, Zenteno R, Hernández J, Vallejo V, Zenteno E (1999). Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of Porcine Rubulavirus LPMV. *Glycoconj. J.* 16: 517-522.
32. Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernández J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E (1997). NeuAc α 2,3-Gal glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 118: 327-332.
33. Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez H, Delannoy P, Zenteno E (2000). Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 126: 415-424.
34. Ramírez-Mendoza H, Hernández J, Santos-López G, Garfias Y, Zenteno E, Reyes-Leyva J. Clinicopathological characterisation of Porcine rubulavirus isolates. Manuscrito en preparación.
35. Santos-López G. Purificación parcial y estudio de las actividades biológicas de la Hemagglutinina-Neuraminidasa de cepas del *Rubulavirus porcino* de virulencia variante. Tesis de Maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 2000.
36. Santos-López G, Herrera-Camacho I, Reyes-Leyva J. Neuraminidase activity in pathogenic variants of Porcine rubulavirus: specificity, affinity and inhibition studies. Manuscrito en preparación.
37. Solórzano A, Zheng H, Fodor E, Brownlee GG, Palese P, García-Sastre A (2000). Reduced levels of neuraminidase of influenza A viruses correlate with attenuated phenotypes in mice. *J. Gen. Virol.* 81: 737-742.
38. Yamamoto-Goshima F, Maeno K, Morishita T, Ueda M, Fujita Y, Nakajima K, Yoshii S (1994). Role of neuraminidase in the morphogenesis of influenza B virus. *J. Virol.* 68:1250-1254.
39. Huberman K, Peluso RW, Moscona A (1995). Hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza 3: role of the neuraminidase in the viral life cycle. *Virology* 214: 294-300.
40. Wagner R, Wolff T, Herming A, Pleshka S, Klenk HD (2000). Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virol.* 74: 6316-6323.
41. Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM (1995). Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly or budding. *J. Virol.* 1099-1106.
42. Price GE, Smith H, Sweet C (1997). Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strains of different virulence. *J. Gen. Virol.* 78: 2821-2829.
43. Morris SJ, Price GE, Barnett JM, Hiscox SA, Smith H, Sweet C (1999). Role of neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis. *J. Gen. Virol.* 80: 137-146.
44. Ahmed R, Biron CA (1999). Immunity to Viruses. En: *Fundamental Immunology*, Fourth Ed. Paul WE. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp. 1295-1334.

45. Hernández-Jáuregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Díaz-Orea A, Reyes-Leyva J, Hernández-Baumgarten E, Moreno-López J (1992). Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del síndrome del ojo azul en cerdos. *Vet. Mex.* 23: 217-222.
46. Zenteno-Cuevas R (1997). Purificación y predicción de determinantes antigénicos y de estructura secundaria en la hemaglutinina-neuraminidasa del paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F.
47. Hernández J, Garfias Y, Nieto A, Mercado C, Montaña LF, Zenteno E (2001). Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to Porcine Rubulavirus: *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79: 249-259.
48. Hernández J, Garfias Y, Reyes-Leyva J, Chávez R, Lascurain R, Vargas J, Zenteno E (2002). Peanut and Amaranthus leucocarpus lectins discriminate between memory and naive/quiescent porcine lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84: 71-82.



Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez-Contreras E, (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVI**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2002).

(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

SIMULACIÓN DEL RECONOCIMIENTO ENTRE PROTEÍNAS Y MOLÉCULAS ORGÁNICAS O DOCKING. APLICACIÓN AL DISEÑO DE FÁRMACOS

A. Jaqueline Padilla Zúñiga y Arturo Rojo Domínguez

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Departamento de Química. Área de Biofísicoquímica
Apartado Postal 55-534, 09340 México. D. F.

jpz@xanum.uam.mx

1. Introducción

Muchos medicamentos actualmente en uso deben su descubrimiento tanto al estudio de remedios tradicionales como al aislamiento de principios activos de productos naturales, o bien a cierto azar, como en el caso de la penicilina (1). Sin embargo, en el desarrollo moderno de fármacos se utiliza la tecnología más sofisticada para realizar búsquedas sistemáticas a gran escala con el propósito de encontrar sustancias cada vez con mayor potencia medicinal y menor toxicidad.

Una primera etapa en el complejo proceso del desarrollo de fármacos es la elección del sujeto de estudio, también conocido como molécula blanco, sobre la que actuará el medicamento para lograr el efecto terapéutico deseado. Diversas investigaciones sobre los fármacos empleados en las últimas décadas han revelado que la acción terapéutica de éstos incide principalmente en proteínas (2), ya sea como

receptores moleculares o como enzimas (Figura 1). Por esta razón, en el diseño racional de medicamentos las proteínas pueden considerarse como la primera opción para fungir como moléculas blanco. La selección de la proteína específica de trabajo dependerá de la información disponible sobre el mecanismo molecular responsable del desarrollo de la enfermedad particular que se estudie.

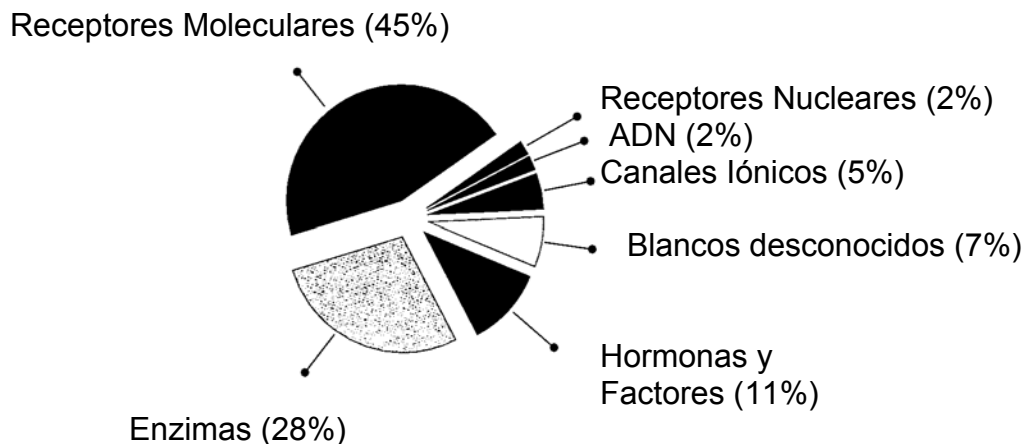


Figura 1. Distribución de moléculas blanco en un estudio sobre 485 fármacos de uso actual.

El efecto deseable en un nuevo fármaco es el control de los procesos bioquímicos alterados en un paciente, o bien el evitar que un organismo patógeno realice sus procesos invasivos naturales. En este último caso, lo ideal es seleccionar como molécula blanco a una proteína que sea indispensable para la supervivencia del organismo patógeno y que esté ausente en el huésped; así, un fármaco que se una a esa proteína e impida su correcto funcionamiento tiene posibilidades de ser un buen antibiótico. La identificación de moléculas blanco con estas características es complicada ya que en muchas ocasiones, la proteína en cuestión existe simultáneamente en el huésped y en la especie patógena y es entonces necesario que el ligando, o fármaco por desarrollar, se fije exclusivamente a la proteína del patógeno (3). En los casos donde la enfermedad que desea tratarse se debe al funcionamiento inapropiado de la maquinaria molecular del propio paciente, es preciso indagar el tipo y modo de acción particular de las enzimas involucradas en la disfunción y elegir como blanco de estudio la molécula que esté mejor caracterizada. La elección del sujeto de estudio puede validarse a través de experimentos que permitan conocer el efecto de la modificación funcional del blanco (o incluso, de la ausencia total del mismo) sobre un microorganismo.

Cuando se trabaja con proteínas, y particularmente con enzimas como sustancias blanco, deben considerarse tres factores importantes: la especificidad o selectividad molecular de la enzima, la afinidad o fuerza con que se fija el sustrato a ella, y la geometría del sitio de unión. Muchos fármacos son inhibidores de la función de una enzima a través de un bloqueo efectivo del sitio activo o de las zonas coadyuvantes de la catálisis (4,5). En estos casos es deseable desarrollar compuestos que se unan

con gran firmeza y alta especificidad a los sitios funcionales, y para desarrollar un fármaco con ambas características es imprescindible conocer con detalle la geometría del sitio de unión.

La siguiente etapa del proceso en el diseño de medicamentos es la identificación de moléculas líder, que son aquellos compuestos que muestran tener una actividad significativamente alta sobre el blanco seleccionado. En esta fase del trabajo es preciso realizar una serie de experimentos en microescala con varios cientos de miles de compuestos distintos. Estos ensayos masivos de laboratorio son realizados rutinariamente por las grandes compañías farmacéuticas; y son costosos dado que requieren de la instrumentación de pruebas biológicas que puedan ser realizadas y analizadas ágilmente, y porque además se requiere de un banco enorme de compuestos químicos que debe ofrecer acceso y consulta expeditos.

Las moléculas líder que demuestran ser químicamente viables y poseer alta actividad biológica son caracterizadas estructuralmente y sometidas después a un proceso de optimización de su potencia farmacológica. En este paso se generan derivados de las moléculas líder, y se determina su estructura tridimensional, así como la relación que existe entre la actividad biológica que manifiestan y algunas de sus propiedades moleculares; tarea que se lleva a cabo con el empleo de la técnica conocida como QSAR (siglas en inglés para *Quantitative Structure-Activity Relationship*) (1). Los resultados obtenidos con esta técnica dirigen el diseño de nuevos compuestos con actividad farmacológica que se presume será mayor a la de los líderes previos. Estos nuevos compuestos deben ser sintetizados en el laboratorio y, si confirman poseer mayor potencia farmacológica, se reincorporan al proceso de optimización en una serie de etapas iterativas. Si alguna de estas sustancias logra unirse con suficiente firmeza al blanco, entonces se realiza un estudio detallado de su viabilidad biológica, su estabilidad química y metabólica, sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, lipofilicidad, etc.), su selectividad y su posible mecanismo de acción. Antes de que un producto salga al mercado, es preciso realizar muchas pruebas sobre organismos específicos para determinar los efectos secundarios y la dosis correspondiente para su administración a seres humanos.

Los ensayos masivos que se llevan a cabo en las primeras etapas del desarrollo de fármacos, requieren de un gran despliegue de recursos puesto que, además de utilizar grandes bancos de datos, es necesario obtener, procesar y almacenar cantidades colosales de resultados experimentales. Por esta razón, en años recientes se ha optado por los estudios *in silico*, donde una simulación molecular por computadora realiza los ensayos masivos con el fin de hallar moléculas líder de una forma eficiente y relativamente económica.

En este texto se describirá un método de simulación por computadora para el desarrollo de fármacos que ha rendido resultados exitosos. Este método de reconocimiento molecular o *docking*, es ampliamente utilizado alrededor del mundo por compañías privadas y por instituciones de investigación pública para el hallazgo de nuevos compuestos con efectos terapéuticos. Si bien la técnica del *docking* representa una alternativa a los procedimientos de ensayo masivo de laboratorio, también, y de

manera más importante, ella ha sido utilizada en el diseño de fármacos, tanto para llevar a cabo las etapas de identificación del sitio de unión sobre el blanco, como las de construcción y evaluación de los complejos moleculares resultantes. En la siguiente sección se describirán los pasos que conforman al *docking* como método para el desarrollo de compuestos farmacéuticos.

2. Simulación del reconocimiento molecular

Para describir la metodología del *docking* es útil dividirla en una serie de etapas (Figura 2). La primera de ellas consiste en disponer de la estructura tridimensional de la molécula blanco, la cual debe ser acondicionada para los cálculos subsecuentes y sobre la que debe identificarse el sitio de unión de una molécula de prueba (generalmente pequeña en relación con el blanco). La siguiente etapa requiere poseer un archivo numeroso de ligandos potenciales, esto es, moléculas orgánicas con estructuras tridimensionales conocidas y que se encuentran en condiciones adecuadas para simular su asociación al blanco. La tercera etapa, que es la parte medular del método, consiste en un algoritmo de computadora que toma cada uno de los ligandos de la base datos y lo coloca dentro del sitio de unión en una gran cantidad de orientaciones (6).

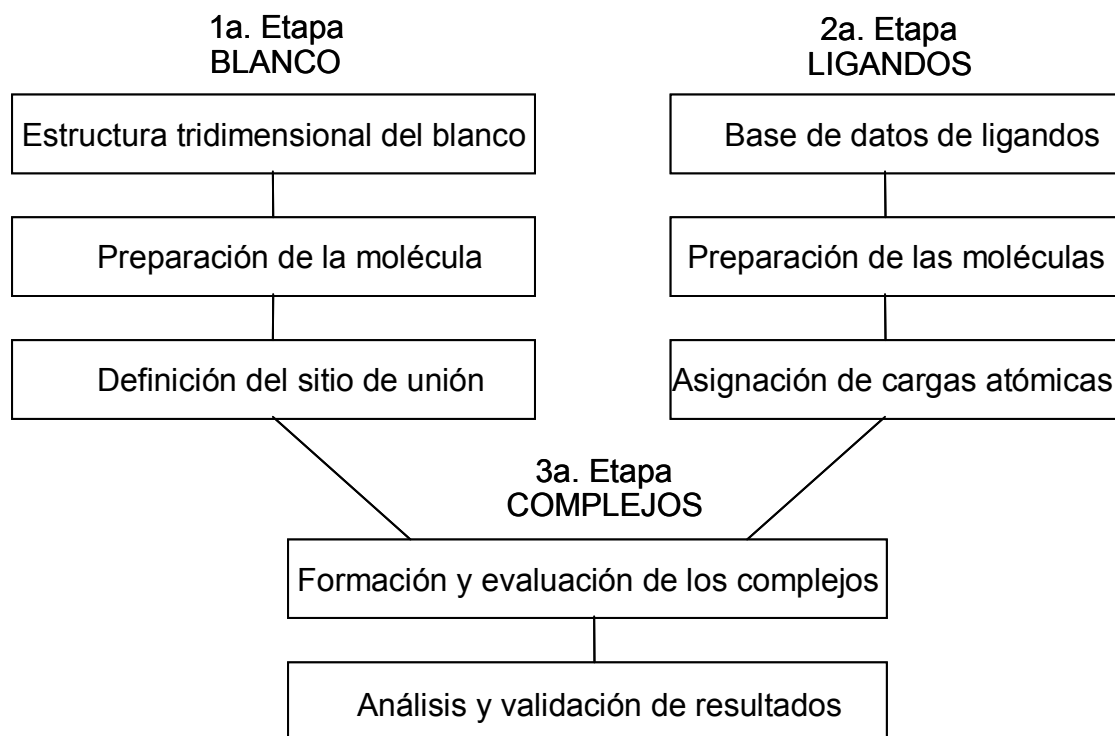


Figura 2. Diagrama simplificado de las etapas de simulación del reconocimiento molecular o *docking*.

Durante esta etapa es indispensable emplear un criterio numérico para distinguir cuál de todas las disposiciones probadas resulta ser la más adecuada, es decir, la que adoptaría el ligando si tuviera acceso al sitio de unión; a este criterio le llamaremos puntaje. Una vez establecidas las condiciones descritas anteriormente, el proceso para probar orientaciones se repite para cada ligando de la base de datos, ésta es la etapa que consume la mayor cantidad de tiempo de cálculo. Finalmente, el programa de cómputo ordena los diferentes compuestos probados de acuerdo al puntaje de su orientación óptima y entonces, el usuario puede analizar estos resultados y planear experimentos para validar los resultados generados en la simulación por computadora. A continuación se discutirán algunos detalles de cada una de las etapas descritas para el proceso de *docking*, donde se utilizará como ejemplo en las figuras a una proteína indispensable en la ruta de la glucólisis, la triosafosfato isomerasa (7) (Figura 3).

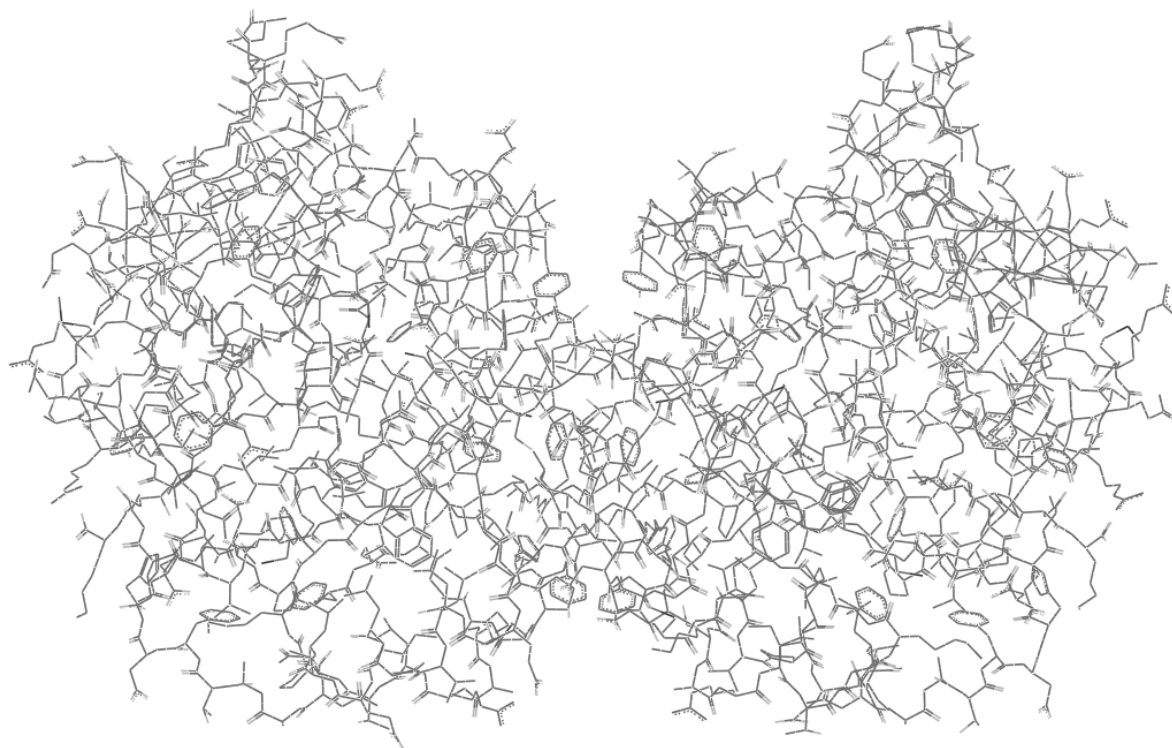


Figura 3. Estructura tridimensional de la triosafosfato isomerasa usada como blanco en el ejemplo de *docking* de este trabajo.

2.1 El blanco y su sitio de unión

2.1.1 Estructura tridimensional

Para un estudio de *docking* es indispensable que la estructura tridimensional del blanco haya sido previamente determinada, ya sea por difracción de rayos X (Figura 3) o por resonancia magnética nuclear. La fuente principal de estructuras tridimensionales de proteínas es el PDB (*Protein Data Bank*), el cual es de acceso gratuito a través de la red en la dirección www.pdb.org. Sin embargo, en la mayor parte de los casos los archivos depositados en esta base de datos no pueden ser utilizados directamente en estudios de diseño de fármacos, sino hasta realizar algunas adecuaciones. Aunque cada caso tiene sus peculiaridades, puede generalizarse que las modificaciones más comunes que deben hacerse a estas moléculas son: la adición de los átomos de hidrógeno, que representan casi la mitad de los átomos totales en una proteína, y cuya posición normalmente no es detectada por la técnica de difracción de rayos X; la remoción de las moléculas de agua que están unidas a la superficie de la proteína, y que con gran frecuencia ocupan el sitio de unión; la eliminación de ligandos presentes durante la determinación de la estructura tridimensional de la macromolécula; y finalmente, el modelado de las regiones que no pudieron ser determinadas experimentalmente o que resultaron ser ambiguas. Para la mayoría de los esquemas de evaluación numérica durante el *docking* es imprescindible conocer la carga eléctrica que corresponde a cada átomo del blanco (y del ligando, como veremos más adelante). Una forma sencilla de establecer estas cargas es asignar, de acuerdo con el pH en la simulación, carga positiva a los átomos de nitrógeno de las cadenas laterales de arginina, lisina e incluso histidina; negativa a cada átomo de oxígeno de los grupos carboxilato; y neutra al resto de los átomos. Sin embargo, este procedimiento no considera los efectos electrostáticos que pueden sufrir los átomos con cargas parciales; por ejemplo, el oxígeno en un grupo carbonilo de la cadena principal puede llegar a tener una carga de hasta -0.4. Para incluir estos efectos en la simulación pueden consultarse valores promedio calculados para cada uno de los átomos de los aminoácidos que constituyen a las proteínas (8) y que normalmente representan una buena opción inicial en la asignación de cargas parciales.

2.1.2 Sitio de unión en el blanco

La superficie de una proteína es irregular, con una serie de protuberancias y cavidades que forman un relieve complejo. Generalmente, es en estas cavidades donde las moléculas orgánicas pueden unirse. Sin embargo, debido al tiempo de cálculo que implica, no es práctico probar el conjunto de las moléculas de la base de datos en todas las orientaciones posibles sobre cada uno de los sitios potenciales de unión. Por ello es necesario seleccionar una sola de esas cavidades para su estudio. Si la proteína es una enzima o un receptor, la elección directa es analizar el sitio activo o de reconocimiento; ya que cualquier molécula que pueda unirse a este lugar impedirá que la proteína realice adecuadamente su función biológica. Lamentablemente, no siempre es posible dirigir el diseño de inhibidores sobre el sitio activo, pues es una región que está muy conservada en diferentes especies a lo largo de la evolución, esto hace que el ligando

se una con la misma afinidad a la enzima de un organismo patógeno que a la del huésped. Existen dos alternativas que para identificar posibles sitios de unión para el reconocimiento de moléculas pequeñas. La primera es computacional y consiste en revisar la superficie molecular en busca de cavidades con ciertas características de tamaño, hidrofobicidad y grupos funcionales. La segunda es experimental y en ella se requiere determinar los sitios donde se albergan moléculas de solvente orgánico que difunden por el cristal de una proteína (9) (Figura 4). La ubicación de tales moléculas de solvente se determina por difracción de rayos X y se consideran probables sitios de unión para un ligando (4). Es necesario enfatizar en este momento que la unión de un ligando en una de estas zonas no necesariamente afectará la función de la enzima.

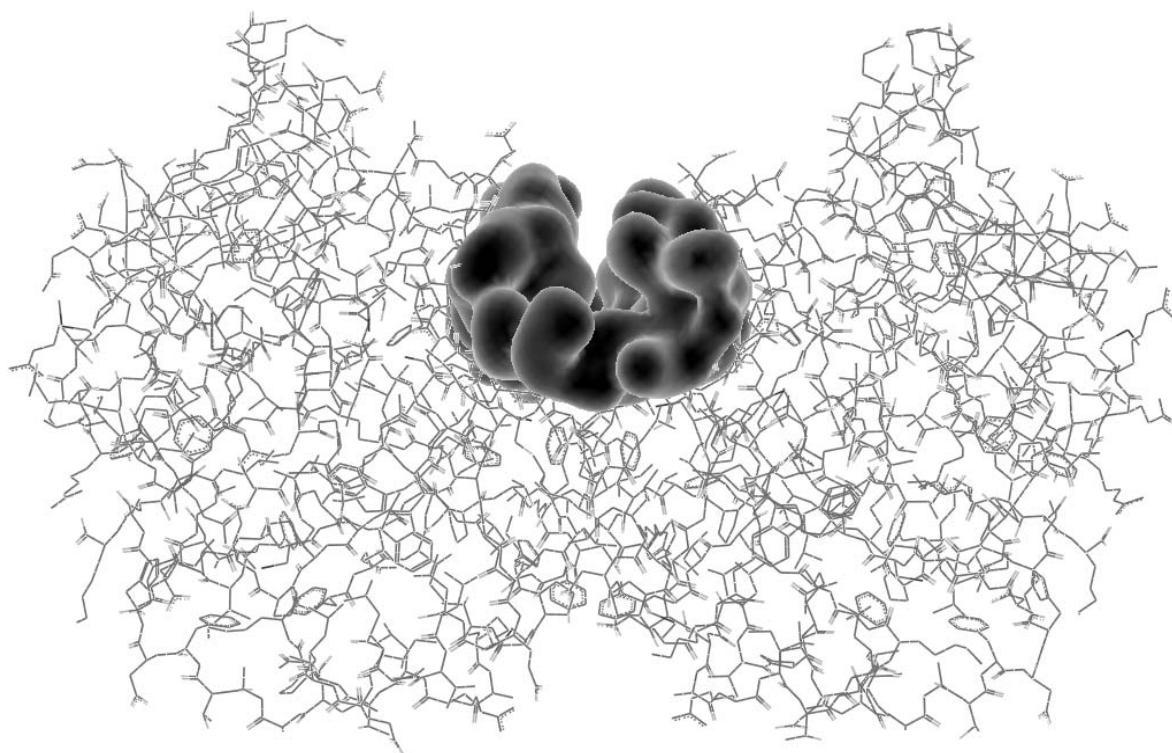


Figura 4. Estructura tridimensional obtenida al permitir la difusión de hexano a través de cristales de la triosafosfato isomerasa. La posición de las moléculas de hexano se muestra en color negro.

2.2 Selección de ligandos

Una vez preparada la molécula blanco cuya función se desea alterar, y ya seleccionada la cavidad o sitio de unión sobre ella, es necesario realizar una búsqueda de las moléculas orgánicas más afines a este sitio que logren actuar como ligandos

potentes. Para esta búsqueda se emplean las grandes bases de datos de compuestos orgánicos que están disponibles a través de la red (10) y que provienen tanto de fuentes públicas como privadas. Aunque el acceso a las primeras es gratuito, la consulta a las segundas resulta bastante oneroso.

Estas bases de datos, que contienen del orden de miles de moléculas distintas, son de gran utilidad en el proceso de *docking*, donde la intención es realizar un muestreo amplio de los compuestos existentes, para así incrementar la posibilidad de éxito en la identificación de sustancias potencialmente útiles como fármacos. Muchas de las moléculas contenidas en las bases de datos que provienen de empresas privadas poseen las características más comunes observadas en los medicamentos conocidos (Tabla I), situación que no es compartida por las fuentes de información públicas. Para hacer uso de los compuestos presentes en cualquiera de estos dos tipos de bases, es necesario someterlos una serie de etapas de adecuación previas a la simulación por computadora. El acondicionamiento a que deben sujetarse las moléculas es similar al discutido en la sección anterior para el blanco, esto es: a) deben añadirse átomos de hidrógeno, ya que en muchos complejos proteína-ligando están involucradas las interacciones de puentes de hidrógeno; b) debe darse una representación tridimensional a las moléculas, pues en la mayoría de los casos sólo se cuenta con una imagen plana o una fórmula codificada de ellas (11-13) y; c) debe estimarse la carga parcial de cada uno de los átomos que constituyen al compuesto. En esta última tarea, debe considerarse que las moléculas pequeñas poseen una mayor variedad de tipos de átomo y grupos funcionales que las proteínas conocidas. Por ello, en vez de emplear tablas de valores promedio para la asignación de cargas, se utiliza un algoritmo basado en cálculos de electronegatividad de los átomos involucrados en cada enlace químico (14).

Debido a que la serie de etapas de preparación debe realizarse sobre cada una de las moléculas que integran las enormes bases de datos de compuestos químicos, se han desarrollado paquetes de cómputo que realizan esta ardua tarea de forma automática y eficiente (15).

| Tabla I. Propiedades moleculares de fármacos potenciales (16) | | |
|--|---------------------|---------------------|
| <i>Propiedad</i> | <i>Valor mínimo</i> | <i>Valor máximo</i> |
| Donadores de puentes de hidrógeno | 0 | 5 |
| Aceptores de puentes de hidrógeno | 0 | 10 |
| Carga eléctrica formal | -2 | +2 |
| Número de enlaces con rotación libre | 0 | 8 |
| Masa molar (Da) | 200 | 500 |
| Número de átomos pesados | 20 | 50 |
| Hidrofobicidad (Log <i>P</i>) ^a | -2 | 5 |
| ^a <i>P</i> se define como el coeficiente de partición entre una fase orgánica y una acuosa. | | |

2.3 Simulación de la formación de complejos

La tarea de acomodar una molécula orgánica en una cavidad de la proteína blanco no es sencilla. Como analogía, podría pensarse en estacionar un automóvil en un sitio estrecho orientándolo al azar en diferentes posiciones, sólo que el caso molecular es tridimensional y no hay información previa de cuál es la colocación correcta. Justamente ésta es la razón para desarrollar esquemas numéricos de puntaje para cada orientación (17). En el más sencillo de estos esquemas se determina el número de contactos totales que pueden establecerse entre cada pareja de átomos del sitio de unión y del ligando, en una orientación particular de éste. Se considera formado un contacto cuando un átomo del ligando y otro del sitio de unión se encuentran a una distancia menor o igual a la de un valor umbral (v.g. 5 Å). Si la forma geométrica del ligando es complementaria a la de la cavidad (Figura 5), una orientación adecuada generará un gran número de contactos y se le asignará un puntaje alto; por supuesto que debe haber penalizaciones por el traslape de cualquier átomo del ligando con los de la proteína para evitar así interacciones no realistas (Figura 6d).

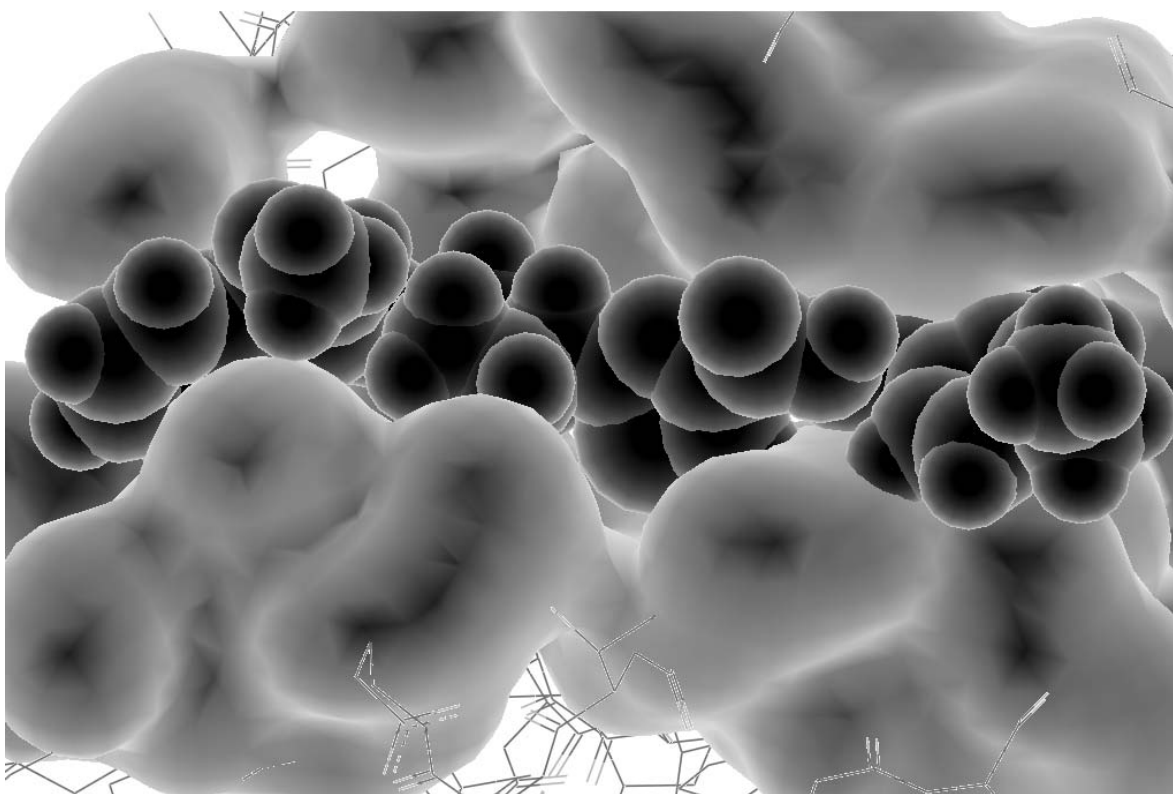


Figura 5. Detalle de la interacción ligando-proteína donde puede apreciarse la complementariedad geométrica de la molécula orgánica (esferas oscuras) y los átomos de la cavidad.

Aunque este criterio de evaluación es bueno para detectar compatibilidad geométrica, no considera la naturaleza de los átomos que interactúan, es decir, otorga el mismo peso a tener dos átomos cercanos con carga del mismo signo que con carga opuesta o sin ella. Una forma alterna y más confiable para asignar puntajes consiste en hacer uso de programas de regularización de geometría o de simulación de dinámica molecular (18). La intención es emplear ecuaciones matemáticas de la física clásica que determinen la energía no covalente de la unión blanco-ligando como función de las distancias atómicas entre moléculas. Por ejemplo, para calcular la energía electrostática entre dos átomos cargados puede utilizarse la ecuación de Coulomb:

$$E = k \cdot \frac{q_B \cdot q_L}{d_{BL}}$$

Donde q_B y q_L son las cargas parciales de un átomo del blanco y uno del ligando, respectivamente, y d_{BL} es la distancia entre ellos. Valores negativos, generados por cargas con signo opuesto, indican interacciones favorables, y viceversa.

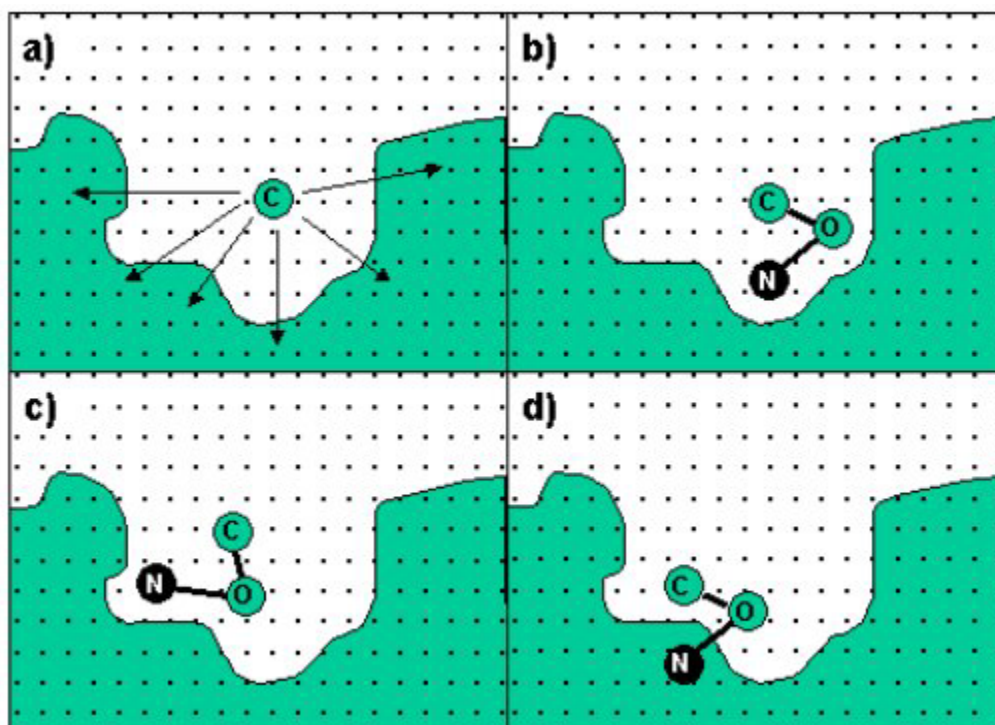


Figura 6. a) Evaluación de la interacción entre un átomo de carbono en un punto de la malla y el sitio de unión, la evaluación se repetirá para cada punto de la malla y para cada tipo de átomo. b) Las interacciones del átomo de carbono (y de los demás) de la molécula ya fueron precalculadas. La energía de interacción es la suma de esos valores. c) Una orientación diferente de la misma molécula requiere los valores precalculados para los átomos en los nuevos sitios de la malla. d) Ejemplo de interacción no realista donde parte del ligando se traslapa sobre la molécula blanco. El átomo de nitrógeno recibe una penalización alta.

De esta forma, como es de esperarse, la menor distancia entre átomos genera la mayor energía de interacción. Para estimar las relaciones de tipo van der Waals existe una expresión matemática típicamente descrita por:

$$E = \frac{A}{d_{BL}^{12}} - \frac{B}{d_{BL}^6}$$

Donde A y B representan los valores de constantes que dependen de la naturaleza de los dos átomos que establecen la interacción. En los cálculos de *docking* es común emplear más de un criterio de asignación de puntaje para evaluar de manera más completa las diferentes orientaciones que adquiere cada una de las moléculas en la cavidad del blanco. Es importante mencionar que los cálculos de energía, debidos tanto a las contribuciones electrostáticas como a las de tipo van der Waals, deben repetirse para cada pareja de átomos que intervienen en el reconocimiento molecular. Si el ligando tuviera 40 átomos y el blanco 8000 ¡el número de contactos que debería calcularse es de más de 300,000 para cada una de las orientaciones posibles del ligando! La tarea computacional crece con el número de átomos así como una gran bola de nieve que se desliza por una ladera, pues la cantidad de orientaciones rígidas a probar puede ser de varios cientos para cada una de las cerca de cien mil moléculas que constituyen las bases de datos de estructuras de compuestos orgánicos. Con el propósito de aligerar el tiempo de cálculo, los diferentes programas de simulación por computadora utilizan una amplia gama de aproximaciones; por ejemplo, dado que las interacciones entre átomos disminuyen con la distancia, pueden obviarse los cálculos que involucren a los átomos más alejados del sitio de reconocimiento. También puede reducirse el número de orientaciones del ligando a través de una selección y evaluación de los arreglos tridimensionales que produzcan los mejores contactos con las paredes de la cavidad (19, 20); volviendo al ejemplo del automóvil que se estaciona, sería equivalente a elegir sólo los arreglos que mantuvieran al menos una llanta a una distancia menor o igual a 30 cm de la banqueta; sin invadirla. Una estrategia más consiste en calcular la energía que tendría un átomo de cada tipo representativo de las moléculas orgánicas (carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre, etc.) que de manera independiente se ubicara en lugares definidos por una malla dentro de la cavidad (Figura 6). Toda la información generada podría entonces ser almacenada y utilizada posteriormente de acuerdo con la naturaleza del ligando y la disposición de sus átomos en la misma cavidad. Esto evita repetir un mismo cálculo miles de veces dado que en general, la energía de interacción de cualquier acomodo del ligando puede determinarse fácilmente mediante la suma de las energías precalculadas para los distintos tipos de átomo considerados.

El uso de las aproximaciones en estos estudios, si bien reduce el tiempo de cálculo, tiene un costo en la precisión de los resultados, de forma que debe encontrarse un balance entre estas dos variables. Se ha visto que un tiempo de cálculo de un minuto por molécula arroja resultados que permiten discriminar a los mejores ligandos dentro de la base de datos analizada, y esto implica que el estudio de un conjunto de 100 mil compuestos, requeriría aproximadamente de dos meses de trabajo de cómputo en un procesador moderno, lo cual es un lapso bastante razonable en un estudio de

docking. Los resultados obtenidos al finalizar los cálculos son dos archivos por cada criterio de puntaje empleado. Un archivo contiene las coordenadas cartesianas de cada átomo del ligando en la mejor orientación dentro de la cavidad del blanco (Figura 7). El otro archivo incluye los nombres o códigos de cada uno de los ligandos, ordenados de acuerdo con el puntaje obtenido para su orientación óptima.

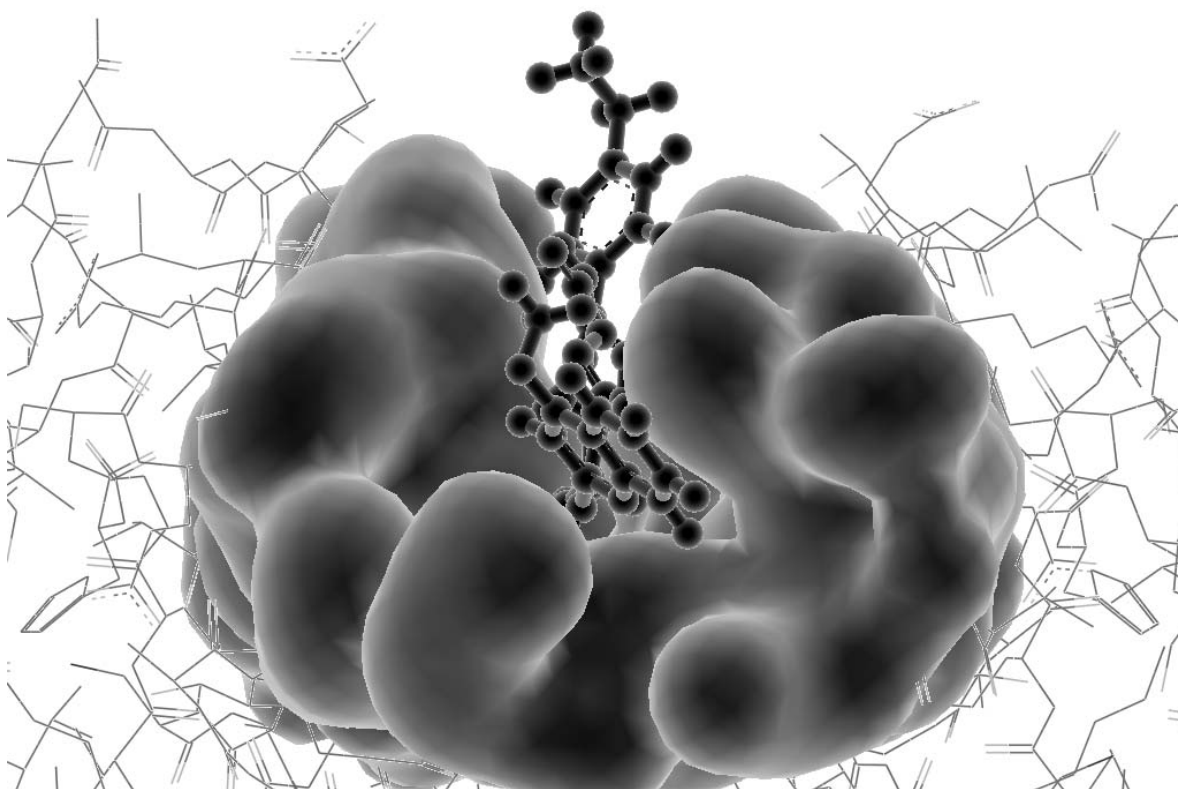


Figura 7. Representación tridimensional generada a partir de las coordenadas cartesianas de los átomos del sitio de unión y del ligando en su orientación óptima.

3. Uso de los resultados del *docking* en el diseño de fármacos

3.1 Identificación de moléculas líder

Las listas de ligandos que se generaron en la etapa anterior contienen a los compuestos ordenados de forma descendente de acuerdo con el puntaje obtenido en cada criterio de evaluación empleado. Si se utilizaran tres de esos criterios se obtendrían tres listados independientes y en ellos se espera que los compuestos que ocupan los primeros lugares manifiesten la mayor afinidad por el blanco. Esta información es importante para los estudios de validación *in vitro* de los resultados del *docking*. Sin embargo, si se analizan los primeros compuestos de las tres listas se

observará que el orden y los nombres de las sustancias no necesariamente coinciden. Esto podría generar un problema para seleccionar a los compuestos que deben ser tratados en las etapas posteriores del diseño de fármacos. A fin de ensayar *in vitro* la potencia biológica de los compuestos estudiados, una estrategia razonable es construir inicialmente un archivo con los 300 compuestos de mayor puntaje de cada lista, evitando las duplicidades. Es conveniente además incorporar a este archivo los compuestos que, sin estar dentro de los primeros 300 lugares, aparezcan simultáneamente en las diferentes listas. El resultado final es un conjunto de cerca de 500 moléculas líder potenciales que deberá ser sujeto a tres etapas posteriores de selección. La primera de ellas elimina a los compuestos que se alejen de los criterios farmacológicos mencionados en la Tabla I, y también excluye a las sustancias que sean intrínsecamente inestables (como derivados de ATP y oxidantes o reductores fuertes), o que contengan metales. En una segunda etapa, los compuestos son discriminados por su accesibilidad, es decir, se conservarán únicamente aquéllos que puedan ser adquiridos ya sea por síntesis química o bien de forma comercial. Esta etapa de selección es imprescindible dado que, para llevar a cabo las pruebas de actividad sobre el blanco, se requiere una muestra física de cada compuesto. Justamente, estas pruebas de laboratorio constituyen la tercera etapa de selección, donde las sustancias que alteren sensiblemente la funcionalidad del blanco son finalmente consideradas como *moléculas líder*, ya que son usadas como guía en el trabajo posterior del diseño de fármacos. En los estudios típicos de *docking*, el número de moléculas líder constituye menos del 30% de los líderes potenciales originales. Ello se debe a las características de las moléculas que integran las bases de datos de compuestos orgánicos y, de manera significativa, a las aproximaciones presentes durante las simulaciones del *docking* (21, 22). Estas aproximaciones, que son necesarias para hacer eficiente el cálculo por computadora, se refieren básicamente al empleo de moléculas rígidas durante la asociación a la cavidad del blanco, y también, a la ausencia de moléculas de solvente explícito (lo que comúnmente se denomina *cálculos en vacío*). Para reducir el efecto de la primera de estas condiciones de trabajo puede generarse un conjunto de conformaciones de un mismo ligando ya sea antes de iniciar la simulación o bien, una vez que se tiene la mejor geometría rígida unida a la cavidad en el blanco. La inclusión de los efectos del solvente en los cálculos por computadora es bastante más complicada que la búsqueda conformacional, pues se requiere conocer la forma en que se ve afectada la interacción molecular por fenómenos tales como: el efecto hidrofóbico de la región interfacial; el estado de ionización (a cierto pH) de los grupos involucrados; el grado de deshidratación de las superficies que interactúan, etc. Las nuevas versiones de los programas de simulación empiezan a incluir rutinas para considerar la flexibilidad molecular y presencia del solvente, al menos de forma simplificada (23, 24).

A pesar de las restricciones que impone la simulación por computadora, los métodos de *docking* no sólo han demostrado ser útiles para identificar moléculas líder exitosas, sino que además en los casos de alta afinidad molecular, han generado representaciones tridimensionales de la interacción proteína-ligando que resultan ser muy similares a las descripciones logradas experimentalmente por difracción de rayos X (25, 26).

3.2 Diseño de derivados de las moléculas líder

Dado que en esta etapa del diseño de fármacos no se espera que los compuestos de trabajo manifiesten una alta afinidad por la cavidad del blanco, la geometría del arreglo generada hasta este momento podría no ser representativa del reconocimiento molecular real. Por esta razón es necesario realizar nuevas simulaciones por computadora que logren una mejor descripción del espacio de conformaciones del ligando. Esto implica ensayar mayor número de orientaciones rígidas y optimizar cada una de ellas, e incluso permitir una mayor movilidad a la molécula orgánica a través de una revisión de sus rotámeros de menor energía. Esta metodología requiere de tiempos de cálculo por molécula relativamente grandes pero accesibles, dado que se estudia un número mucho menor de compuestos respecto al de la primera etapa de la simulación. La importancia de tener orientaciones confiables de los ligandos radica en que éstas permiten postular hipótesis sobre las características moleculares de la unión y la manera en que podrían modificarse las estructuras para aumentar su afinidad (o selectividad) por el blanco. Con base en esas premisas es posible diseñar derivados de los compuestos líder sobre los que se realicen nuevas simulaciones del reconocimiento molecular, así como pruebas de laboratorio de su capacidad inhibitoria sobre el blanco. Toda esta información permite conocer detalles específicos de la fisicoquímica de la interacción ligando-proteína tales como: la naturaleza polar o hidrofóbica de los grupos participantes; la existencia de grupos ionizables involucrados en el reconocimiento, la cooperatividad y el tipo del proceso de inhibición e incluso la identificación de los puentes de hidrógeno más importantes para la asociación. Este trabajo genera por una parte, a un nuevo grupo de compuestos líder caracterizados y con afinidad mejorada; y por otra, información que ayuda a ratificar o rectificar las hipótesis sobre los detalles de la unión, con lo que se retroalimenta el proceso de diseño y ensayo. En un proceso iterativo que puede requerir varios ciclos, el grupo de moléculas líder optimizadas dará origen a un nuevo conjunto de derivados, que a su vez volverá a ser sometido a las etapas de simulación y experimentación. Cuando se tiene un número suficientemente grande de derivados de una molécula líder cuya actividad inhibitoria es conocida, puede utilizarse la metodología de QSAR (27) para predecir las características necesarias en nuevos derivados y de esta forma sistematizar el diseño de los ligandos de las nuevas etapas.

El proceso descrito en el párrafo anterior puede conducir al descubrimiento de moléculas cuya afinidad, medida por su K_i , se encuentra del orden de mili o micromolar en la etapa de selección de líderes, y hasta de nano o picomolar cuando se han localizado los mejores derivados de estos líderes. La selectividad también mejora durante este proceso, y en ocasiones es necesario comprometer uno de estos dos factores para favorecer al otro. Una etapa final requiere que las simulaciones realizadas originalmente *in silico* y que propusieron a los ensayos *in vitro* se conviertan en experimentos *in vivo*, pues debe probarse que los compuestos que muestran gran afinidad y selectividad por el blanco no interfieren significativamente con otros procesos dentro de un organismo y que los productos de degradación del ligando tampoco resulten ser tóxicos.

4. Consideraciones finales

En este trabajo consideramos interesante enmarcar al *docking* como una de las varias etapas en el diseño de nuevos fármacos. Con ello esperamos haber logrado transmitir una visión más amplia de esta técnica y haber enfatizado que las simulaciones por computadora no sustituyen a los experimentos y pruebas físicas, sino que permiten plantear una aproximación complementaria del sujeto de estudio, al proporcionar el detalle de la unión proteína-ligando a escala molecular y atómica. No es sorprendente que muchas compañías farmacéuticas utilicen los métodos computacionales para sus proyectos de investigación. Sin embargo, el tránsito desde el proyecto inicial hasta tener un producto comercial es largo y costoso, lo que obliga a las empresas a centrar sus mayores esfuerzos en descubrimientos que les permitan recuperar rápidamente su inversión. Por este motivo, es difícil que la iniciativa privada se interese en la cura de enfermedades que son características de sectores de bajos ingresos; a pesar de que son los más numerosos. Esta situación es una excelente justificación para que las universidades e institutos de investigación públicos dediquen sus esfuerzos al diseño de fármacos contra los padecimientos que afectan a esos sectores marginados.

Con el sorprendente desarrollo tecnológico que ha logrado la humanidad en las últimas décadas es fácil predecir que cualquier campo del conocimiento logrará tener avances espectaculares en pocos años. En el estudio de ligandos potenciales de un blanco actualmente se tienen equipos automatizados que son capaces de realizar experimentos de inhibición de una proteína con decenas de miles de sustancias en tiempos reducidos, y se espera que este volumen continúe creciendo en las siguientes décadas. Respecto a los ensayos computacionales, se espera que las capacidades de almacenamiento de información y de velocidad de cálculo continúen incrementándose rápidamente. Recientemente, se han construido cúmulos de cientos de procesadores de alto desempeño que logran incrementar la velocidad de cálculo al dividirse el trabajo para resolver un problema particular, un caso ideal para el *docking* masivo. Puede pronosticarse que la precisión de esta metodología de diseño de fármacos aumentará notablemente al reducir el número de aproximaciones en los modelos de asociación y al incorporar un número cada vez mayor de factores que intervienen de manera significativa en la afinidad molecular. En conjunto, la información obtenida en cada uno de los proyectos que involucren simulación molecular por computadora no sólo generará un enorme número de nuevos medicamentos en el futuro, sino que nos enseñará detalles insospechados de la acción molecular en sistemas biológicos que, muy posiblemente, producirán los adelantos nanotecnológicos de las siguientes décadas.

Referencias

1. Leach AR (1996). Molecular modeling. Principles and applications. Addison Wesley-Longman Ltd. Essex, Inglaterra. pp. 543-585.
2. Eglén RM, Schneider G y Böhm HJ (2000). High-throughput screening and virtual screening: Entry points to drug discovery. En: Virtual screening for bioactive

- molecules (Böhm HJ y Schneider, G eds.) Wiley-VCH. Weinheim, Alemania. pp. 1-14.
3. Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga RA, Rojo-Domínguez A y Pérez-Montfort R (1995). Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action. Studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol* 2:847-855.
 4. Mattos C y Ringe D (1996). Locating and characterizing binding sites of proteins. *Nature Biotechnol* 14:595-599.
 5. Rarey M, Wefing S y Lengauer T (1996). Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *J Comp Aid Mol Des* 10:41-54.
 6. Lengauer T y Rarey M (1996). Computational Methods for Biomolecular Docking. *Curr Op Struct Biol* 6:402-406.
 7. Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A y Pérez-Montfort R (1998). Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J Mol Biol* 283:193-203.
 8. Weiner SJ, Kollman PA, Nguyen DT y Case DA (1986). An all atom force field for simulation of proteins and nucleic acids. *J Comp Chem* 7:230.
 9. Gao XG, Maldonado E, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A y Rodríguez-Romero A (1999). Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10062-10067.
 10. National Cancer Institute. <http://cactus.cit.nih.gov/>
 11. Weininger D (1998). SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *J Chem Inf Comput Sci* 28:31-36.
 12. **Simplified Molecular Input Line Entry Specification** <http://www.daylight.com/>
 13. CORINA. <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/software/corina/index.html>
 14. Gasteiger J y Marsili M (1980). Iterative partial equalization of orbital electronegativity. A rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* 36:3219-3228.
 15. Techniques for Organic Reactions Visualization and Spectroscopy (TORVS) <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/>
 16. Walters WP, Stahl MT y Murcko MA (1998). Virtual screening. An overview. *Drug Discov Today* 3:160-178.
 17. Clark RD, Strizhev A, Leonard JM, Blake JF y Matthew JB (2002). Consensus scoring for ligand/protein interactions. *J Mol Graph Model* 20:281-295.
 18. Goodman JM (1998). Chemical applications of molecular modeling. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, Inglaterra. pp. 15-30.
 19. Rarey M, Kramer B, Lengauer T y Klebe G (1996). Predicting receptor-ligand interactions by an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* 261:470-489.
 20. Kramer B, Rarey M y Lengauer T (1999). Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins Struct Funct Gen* 37:228-241.
 21. Ewing JA y Kuntz ID (1997). Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. *J Comp Chem* 9:1175-1189.
 22. Freire E (2002). Designing drugs against heterogeneous targets. *Nature Biotechnol* 20:15-16.

23. Jones G, Willett P y Glen RC (1995). Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol* 245:43-53.
24. Rarey M, Kramer B y Lengauer T (1999). The particle concept: Placing discrete water molecules during protein-ligand docking predictions. *Proteins Struct Funct Gen* 34:17-28.
25. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR y Taylor R (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 267:727-748.
26. Bissantz C, Folkers G y Rognan D (2000). Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J Med Chem* 43:4759-4767.
27. <http://www.netsci.org/science/compchem/>



del Arenal Mena IP, Cea Bonilla A, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2002).

(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

IMPORTANCIA DE LA BIOFÍSICA EN LA MORFOGÉNESIS DE LOS HONGOS. MODELOS CIBERNÉTICOS Y MATEMÁTICOS PARA SIMULAR EL DESARROLLO CELULAR

Salomón Bartnicki-Garcia

Unidad de Biología Experimental y Aplicada

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

(CICESE), 22830, Baja California, MÉXICO

bartnick@cicese.mx

Introducción

¿Cómo es que un ser vivo puede construir estructuras celulares de gran variedad y con tanta precisión? Conocemos a fondo la bioquímica de los procesos celulares. La célula es básicamente un reactor químico muy complejo en el cual miles de conversiones químicas transforman a los nutrientes en las diversas macromoléculas y otros compuestos que van a ser parte del armazón estructural de la célula.

Pero en la mayoría de los casos, sabemos muy poco de cómo estos componentes se integran espacialmente para construir el edificio celular con todos sus compartimentos internos. El origen de la morfología celular sigue en espera de nuevas ideas más allá de lo que la bioquímica nos ha enseñado. Parte de la deficiencia estriba en que se ha descuidado la parte biofísica de los procesos morfogenéticos.

Auge inicial de la biofísica

Curiosamente, antes de que la bioquímica, y especialmente la subdisciplina llamada biología molecular, dominaran el panorama de la investigación biológica, la biofísica estaba a la vanguardia en los estudios de fisiología de los hongos. Uno de los primeros usos del microscopio electrónico en biología condujo al descubrimiento de la naturaleza fibrilar de las paredes celulares de las plantas y los hongos (1,2). Ello abrió las puertas para numerosos estudios sobre la estructura de la pared celular. Basándose en las propiedades físicas de las microfibrillas y su orientación, se formularon nuevas ideas para entender el crecimiento y la forma celular de los hongos (3-5).

La morfogénesis de los hongos.

Entre los organismos eucarióticos, los hongos poseen virtudes que los hacen atractivos como ejemplares para la experimentación. En ellos podemos ver cambios de morfología muy sencillos pero muy vistosos, como por ejemplo el dimorfismo levadura-micelio (6). Esta dualidad morfológica resulta muy conveniente, pues permite hacer preguntas fundamentales sobre la morfología celular en un sistema que se puede manejar y controlar fácilmente ajustando las condiciones de cultivo.

Durante el transcurso del siglo pasado, se hicieron un buen número de estudios tratando de entender las bases bioquímicas de estos cambios morfogenéticos pero todos ellos terminaron en un callejón sin salida. ¿Por qué? Porque después de numerosos intentos de hallar claves para descifrar las bases bioquímicas del desarrollo, se llegó a la conclusión de que la morfogénesis no obedecía a una sola reacción, o inclusive a unas cuantas rutas metabólicas, sino al resultado integrado del conjunto de actividades metabólicas de la célula (6, 7). Igualmente el abordaje genético, por análisis de mutantes con defectos morfológicos, dio a fin de cuentas, el mismo resultado negativo (8). Y aquí es donde estamos hoy en día, tratando de entender la morfogénesis en un marco holístico, donde es necesario lidiar lo más posible con la totalidad de la célula. Las reglas o leyes de este nuevo juego están por descifrarse.

Biología celular de la morfogénesis

En este artículo la discusión está enfocada al problema de la morfogénesis en las hifas. Estas células tubulares se alargan continuamente por la punta, manifestando un crecimiento apical altamente polarizado (Fig. 1). La hifa es el denominador común de la gran mayoría de las especies fúngicas y por tanto el crecimiento apical viene a ser el mecanismo universal de crecimiento en el quinto reino biológico (9). No obstante todo lo que ya se sabe sobre la fisiología, citología y bioquímica de los hongos, el crecimiento apical sigue siendo uno de los grandes misterios de la biología de los hongos.

Para los fines de este artículo, las tres estructuras celulares más importantes son la pared celular, las vesículas y el citoesqueleto.

- 1) La pared celular, porque ésta es la estructura esencialmente rígida donde descansa la forma de la célula (10).
- 2) Las vesículas, porque son el vehículo donde se transportan a la superficie los componentes para fabricar la pared celular (11-14).
- 3) El citoesqueleto, porque parece ser el camino por el cual se desplazan las vesículas dentro de la célula (15).

Por lo que a procesos se refiere, se consideraron principalmente dos:

- 1) La exocitosis, o sea la secreción de precursores de la pared por medio de vesículas. Como veremos, el patrón de descarga de vesículas es lo que ultimadamente determina el patrón de crecimiento.
- 2) La presión interna o turgencia de la célula. Los hongos registran presiones muy altas del orden de 5-15 atmósferas (16) que proveen la fuerza física para que se expanda la célula.

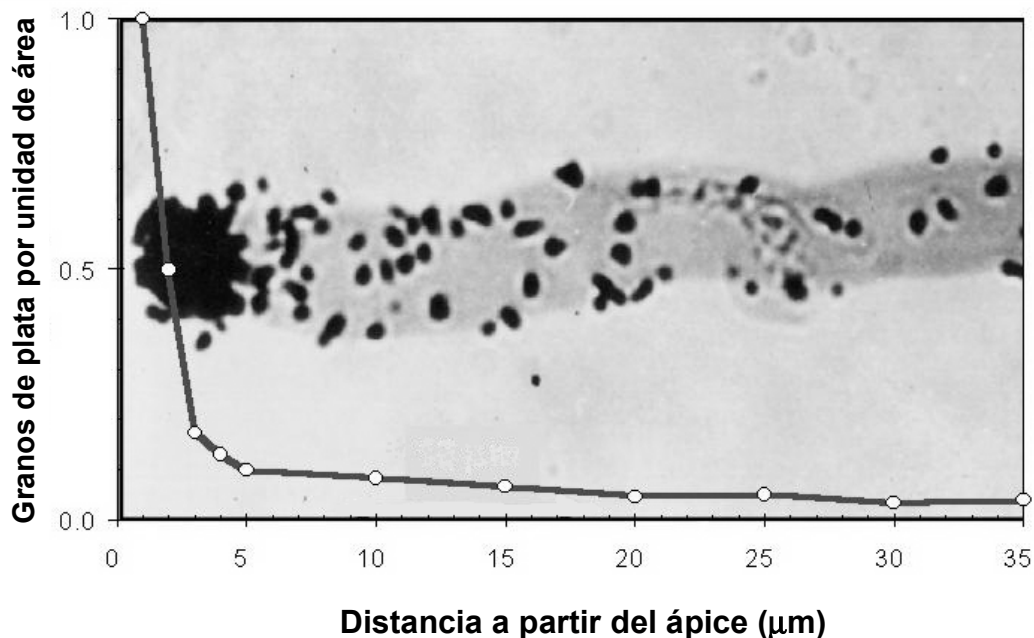


Figura 1. Evidencia autorradiográfica de que la síntesis de la quitina y quitosana está altamente polarizada en el tubo germinal de *Mucor rouxii*. La curva grafica el número de granos de plata por unidad de área contra la distancia a partir del ápice. La síntesis es máxima en el polo apical y desciende rápidamente en la región subapical. Montaje basado en una publicación previa (17).

El hecho de que las vesículas que construyen la pared sean elementos móviles dentro de la célula, es la base para entender cómo la célula puede controlar su forma y crecimiento mediante el patrón de descarga de las vesículas. El caso más sencillo es el de una célula esférica, cuya forma podemos atribuirle a una descarga uniforme de vesículas por toda la superficie de la célula. Por el contrario, en las hifas las descargas vesiculares están altamente concentradas en la punta, como se demostró hace mucho por autorradiografía (Fig. 1). Estos dos patrones distintos de descarga de vesículas nos dan la pista inicial para explicar cualitativamente las dos morfologías opuestas: tubos vs. esferas. Pero aún cuando esto formulaba más claramente el problema de la morfogénesis,

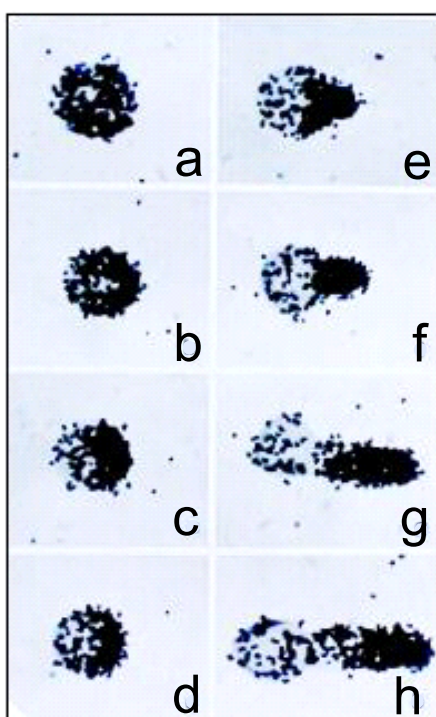


Figura 2. Autorradiografía de la germinación de esporas de *Mucor rouxii*. Esta secuencia muestra la polarización progresiva de la síntesis de pared (quitina y quitosana) *antes* (a-d) y *después* (e-h) de que empiece a salir el tubo germinal. Modificado de una secuencia publicada previamente (18).

no lo resolvía; obviamente quedaba por demostrar el punto clave: ¿Cómo adquieren las vesículas sus instrucciones para formar estos dos patrones de descarga? Si pudiésemos contestar esto podríamos saber el origen del gradiente de crecimiento que caracteriza al crecimiento apical (Fig. 1). Otra pista importante se obtuvo al estudiar el patrón de crecimiento de la pared durante la germinación de una espora, donde se produce un cambio drástico de morfología de la esfera germinal al tubo de germinación (Fig. 2). Este cambio en el patrón de crecimiento se registra sin que haya ningún otro cambio apreciable en el metabolismo o la fisiología de la célula (18). Esto quiere decir que la polarización del crecimiento es un proceso muy sutil que no involucra cambios apreciables en el metabolismo general.

Reduccionismo fisiológico: Modelos matemáticos del crecimiento polarizado

Ante la imposibilidad de encontrar el secreto de la polarización de la exocitosis en el cúmulo de conocimientos fisiológicos, citológicos, bioquímicos y genéticos, optamos por buscar otra salida. Se nos ocurrió que si pudiésemos describir teóricamente las trayectorias que deberían seguir las vesículas para dar el patrón de crecimiento polarizado de la hifa, conseguiríamos una pista para definir qué es lo que guía o establece el

gradiente de formación de pared. Era necesario tener un buen dominio de las matemáticas, algo fuera de nuestro alcance, pero tuvimos la buena fortuna de haber encontrado un colega ideal en un departamento vecino. Gerhard Gierz del departamento de Matemáticas de la Universidad de California, Riverside, tuvo la paciencia para entender de qué se trataba el fenómeno biológico, la perspicacia para sugerir junto con otro de sus colaboradores, F. Hergert, que la manera de abordar esta cuestión no era por deducción abstracta sino haciendo intentos de simular el proceso de crecimiento en la computadora, y luego la destreza para hacer la formulación matemática del proceso. En esta empresa fue necesario plantear el problema de manera que alguien sin experiencia en cuestiones biológicas lo pudiese entender. Y para ello recurrimos al máximo del reduccionismo fisiológico:

Imagínense que esta habitación donde estamos es una célula. Y que las paredes están hechas de unos ladrillos muy especiales. Dentro de la célula hay una fábrica de ladrillos (que le llamamos aparato de Golgi), cada ladrillo viene envuelto en una membrana, y este paquete es lo que denominamos vesícula. Lo que la célula del hongo hace es lanzar las vesículas, o sea los ladrillos, contra la pared. Estos ladrillos son muy especiales, pues en vez de rebotar o desintegrarse con el impacto, se insertan en la pared existente y hacen que aumente su superficie. La expansión se produce porque el recinto celular está a alta presión. Me es fácil imaginar lo que sucedería con la forma de la célula si las vesículas salen disparadas en todas direcciones: la célula se va a expandir igualmente por doquier, y se va generando una esfera cada vez más grande. La pregunta clave es ¿cómo debe organizar la célula los disparos de ladrillos para fabricar un tubo? Los datos que tenemos nos indican que las vesículas se concentran en una región relativamente pequeña en la punta de la hifa. ¿Pero qué distribución espacial de los disparos se necesita para forma un tubo?

Modelo bidimensional del crecimiento: "Fungus Simulator"

Con este símil ultrasimplificado del proceso de secreción, Gierz y Hergert elaboraron un programa cibernético que hacía crecer a una célula en dos dimensiones (2D) en la pantalla del monitor. Lo que posteriormente se refinó y se llamó el Fungus Simulator® (19) (disponible por Internet en el sitio <http://boyce3427.ucr.edu>). En éste modelo, cada vesícula es un pixel. A partir de un punto en la pantalla, que se denominó "centro suministrador de vesículas" o CSV (el "vesicle supply center" o VSC en inglés), se programa para que salgan continuamente vesículas en todas direcciones. Cuando una vesícula encuentra un pixel que esté fuera del límite de la forma o "célula" se adicionan al borde de la misma (i.e. se cambia el color del pixel). Si el CSV se mantiene fijo, lo que se obtiene es un círculo que se va agrandando a medida que llegan más vesículas. Y fue así como al estar "jugando" con el programa nos dimos cuenta que había una manera muy elemental de cambiar o modular la forma de la célula. Bastaba simplemente con mover la fuente de donde provenían las vesículas, el CSV, para cambiar la forma de la célula en

crecimiento. No había que cambiar ni la dirección ni la intensidad de los disparos, sólo la posición del CSV. Y si el CSV se mueve continuamente en línea recta, automáticamente se “polariza” el crecimiento y se produce una forma tubular que crece en la punta y cuya morfología es casi idéntica a la de las hifas (Fig. 3).

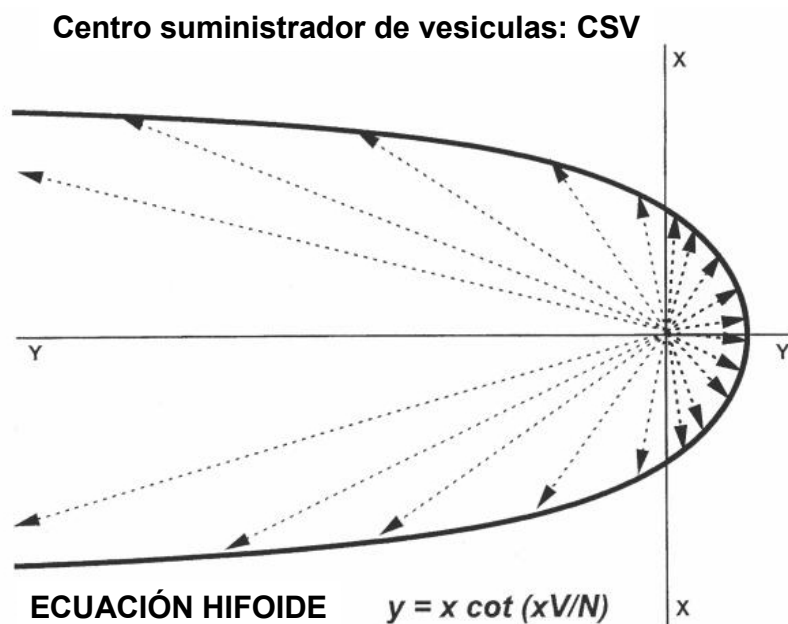


Figura 3. Gráfica de la ecuación hifoide. Las flechas indican la dirección en que las vesículas parten del CSV (centro suministrador de vesículas) y terminan descargando su contenido en la membrana celular. Se ve como la densidad de la descarga vesicular es máxima en el domo apical y disminuye rápidamente en la región subapical. El crecimiento de la hifa está determinado por el desplazamiento del CSV sobre el eje Y. Modificado del original (20, 25).

geométrica que es copia fiel de la forma que tienen las puntas de las hifas (Figs. 3 y 4). Esta curva, llamada hifoide, describe con mucha precisión no solo la punta, sino también el resto del tubo de una hifa real. Aquí lo que hay que remarcar es que la forma hifoide se obtiene como consecuencia de un proceso de crecimiento.

La ecuación de una hifa

Una vez que se vio que el simulador podía reproducir la morfología de la hifa, se procedió a describir el proceso matemáticamente con los siguientes resultados:

1) Al final de la derivación matemática se obtuvo una ecuación de exquisita sencillez:¹

$$y = x \cot(xV/N)$$

la cual resulta de utilidad inmediata pues los dos parámetros V y N tienen un significado fisiológico preciso: V es la velocidad con que se mueve el CSV y N es el número de vesículas por unidad de tiempo emanadas del CSV.

2) Al graficar esta ecuación se obtiene una figura

¹ Las variables “x” y “y” son las coordenadas cartesianas de la curva hifoide creciendo sobre el eje de las ordenadas.

3) Y lo que es muy significativo, el CSV de la ecuación coincide con el sitio donde se encuentra una estructura apical, llamada Spitzenkörper (Fig. 4), y la cual es principalmente una aglomeración de vesículas que por mucho tiempo se sospechaba tenía algo que ver con el crecimiento apical (21).

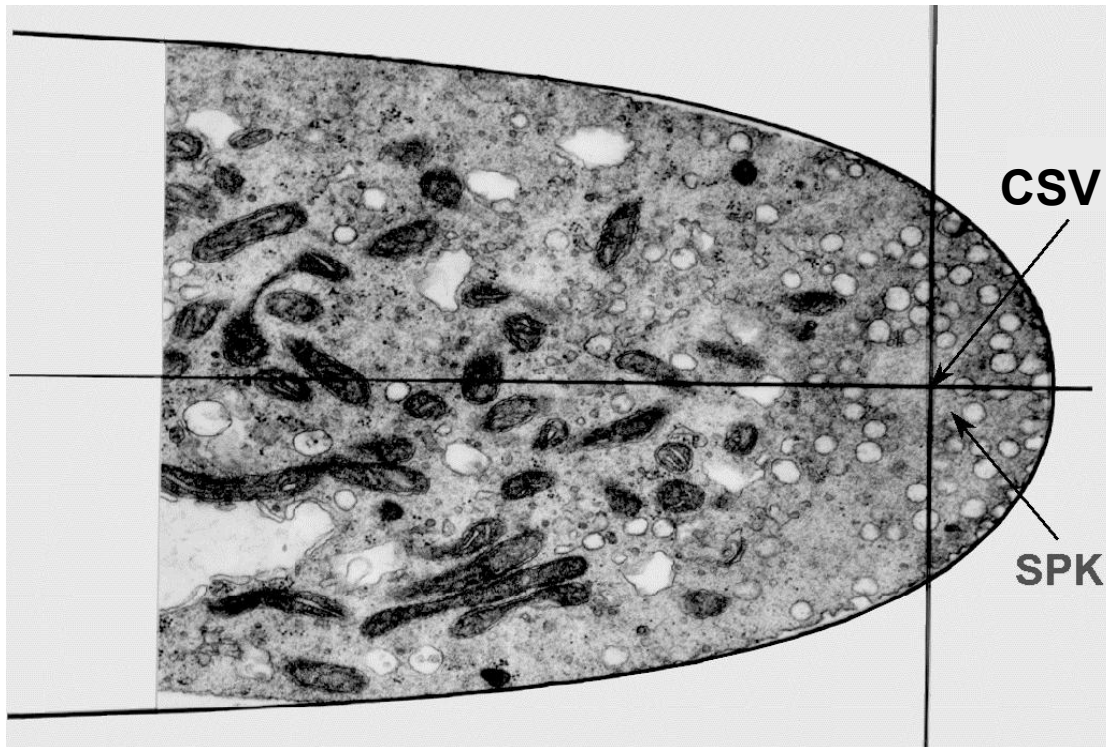


Figura 4. Correspondencia morfológica entre la célula y el modelo del CSV. La gráfica muestra dos coincidencias: 1) La curva de la ecuación hifoide corresponde al perfil de una hifa de *Armillaria mellea* vista en el microscopio electrónico (11). 2) El centro suministrador de vesículas (CSV) de la curva hifoide corresponde con el centro del Spitzenkörper (SPK). Tomada de una publicación anterior (20). Micrografía proporcionada por Charles E. Bracker (11).

El Spitzenkörper como CSV

La mayoría de los hongos superiores presentan en las puntas de sus hifas una estructura dinámica denominada Spitzenkörper (Spk). Uno de los descubrimientos más importantes logrados por microscopia electrónica de transmisión fue ver que el Spitzenkörper era una acumulación de vesículas, junto con elementos citoesqueléticos y material amorfo no caracterizado (11, 22, 23). El éxito del modelo cibernético en reproducir morfologías típicas de las células de los hongos, y la coincidencia entre la posición del CSV del modelo y el Spk de la hifas, nos dio una razón de mucho peso para proponer que la función del Spk es la de servir como centro suministrador de vesículas.

Basándonos en esta hipótesis hemos podido explicar no sólo el crecimiento apical de las hifas sino también otros tipos de morfogénesis celular en los hongos. Cabe aclarar aquí que las vesículas no se originan en el CSV, pues no hay evidencia citológica de que las vesículas que construyen la pared celular se formen en la punta de una hifa. El CSV vendría a ser el centro que recoge el gran número de vesículas que provienen de la región subapical, para luego liberarlas en cualquier dirección al azar hacia la superficie de la célula.

Lo que se hizo en estos estudios fue seguir el comportamiento del Spk durante el crecimiento de células vivas. Se utilizaron las nuevas técnicas de videomicroscopía de alta resolución para obtener una grabación en videocinta del crecimiento de las células. Por medio de análisis electrónico de imágenes, se mapean dos cosas: la posición del Spk a medida que la célula crece y el perfil de la célula. El primero nos permite reconstruir la trayectoria del Spk a intervalos tan cortos como sea necesario, generalmente 2-5 segundos; el segundo, a intervalos más largos, nos permite calcular la cantidad de crecimiento (en área) por cada intervalo. Estos dos grupos de datos se transfieren al Fungus Simulator. Al correr el programa el simulador genera morfologías muy parecidas a las de las células analizadas. Es decir, en todos estos casos podemos decir que la morfología se derivó de un Spk que funcionó suministrando vesículas en todas direcciones a medida que avanzaba. En pocas palabras, el movimiento del Spk actuando como CSV, genera el gradiente de descargas vesiculares que le da la forma a la hifa. Los gradientes de crecimiento de la pared celular son por tanto, el resultado directo del movimiento continuo del CSV.

El modelo del CSV puede explicar diversos casos de morfogénesis, incluyendo cambios en la dirección de crecimiento de las hifas (24), formaciones anulares (25), ciertas deformaciones espontáneas de las hifas (26), el dimorfismo micelio-levadura (27), la morfología aberrante de las mutantes *ropy* (28), la ramificación apical (29), etc.

El modelo CSV tridimensional: Lecciones inesperadas

A pesar de que el modelo bidimensional nos había sido muy útil para elucidar la función del Spitzenkörper, quedaba la duda, expresada por otros (30, 31), de que el modelo carecía de realismo, ya que obviamente no podía capturar los aspectos tridimensionales del crecimiento. Inicialmente nos pareció que tal deficiencia no presentaría gran problema, pues bastaría con que le diéramos un giro de 360° al hifoide bidimensional por su eje longitudinal, para obtener la versión tridimensional (20). La realidad fue otra.

PRIMERA LECCIÓN: La especulación es un arma de dos filos. La información usada para modelar en dos dimensiones resultó insuficiente para producir un modelo tridimensional.

Cuando mi colega Gierz trató de derivar un modelo en tres dimensiones basado en el mismo principio del CSV, se topó con una barrera matemática. La derivación se estancó en un juego de tres ecuaciones que quedaron indeterminadas por falta de información (32). Las ecuaciones no podían resolverse a menos que se introdujera otro factor, que resultó ser el patrón espacial de expansión de la superficie celular. Es decir, en el modelo tridimensional, mas no en el bidimensional, se necesita saber en qué dirección se desplaza la pared existente al insertarse nuevos "ladrillos".

Para solventar este obstáculo se consideraron un número de soluciones teóricas; las más probables están ilustradas en los 3 patrones de expansión superficial mostrados en la Figura 5. En los tres casos se producen hifoides tridimensionales, pero en cada uno el desplazamiento de la superficie es diferente:

Hifoide isométrico: la superficie se desplaza lateralmente en todas las direcciones tangenciales al plano de la pared.

Hifoide ortogonal: el material existente se desplaza perpendicularmente al plano de la pared.

Hifoide rotacional: la pared se desplaza siguiendo fielmente la geometría de un sólido de revolución basado en el modelo bidimensional.

Aunque las tres soluciones producen hifoides tridimensionales bastante parecidos, sus patrones de expansión son muy diferentes (Fig. 5). ¿Cuál es el patrón que verdaderamente ocurre en la hifa? Esto es algo que sólo se podía resolver experimentalmente.

SEGUNDA LECCIÓN: Las buenas intuiciones triunfan...tarde o temprano. Tenía razón Reinhardt (1892).

Para determinar el patrón espacial de expansión de la superficie de las hifas recurrimos al uso de marcadores de superficie. Años atrás, otros investigadores habían tenido éxito marcando la superficie de las células de plantas y de hongos con partículas inertes (carbón, almidón, oro, etc). El marcaje sirvió para delimitar a grandes rasgos las zonas de crecimiento (12, 33). En nuestro caso se necesitaba mayor precisión, pues había que detectar movimientos minúsculos en células que medían escasamente 5-8 μm . Gracias a la videomicroscopía pudimos registrar y resolver desplazamientos de partículas con una resolución de 0.1 μm . Los mejores resultados se obtuvieron marcando la superficie de los ápices de las hifas de *Rhizoctonia solani* con partículas de carbón (tinta china) (34). Las partículas se adhieren firmemente a la superficie y sirven como marcadores de su crecimiento. Para facilitar el análisis matemático, escogimos partículas adheridas al perfil longitudinal de la célula (Fig. 6). Se trazó la trayectoria de cada partícula desde su contacto inicial con la superficie del ápice hasta su posición final en la parte tubular de la hifa. En todos los casos, las partículas siguieron una trayectoria ortogonal, es decir, la expansión de la pared fue siempre perpendicular a la superficie de la célula (Fig. 7). Estos

resultados se reforzaron con observaciones del desplazamiento de irregularidades en la pared celular que nos sirvieron de marcadores internos de la superficie celular. Igualmente se vio que el desplazamiento de estos marcadores internos seguía el patrón ortogonal (34).

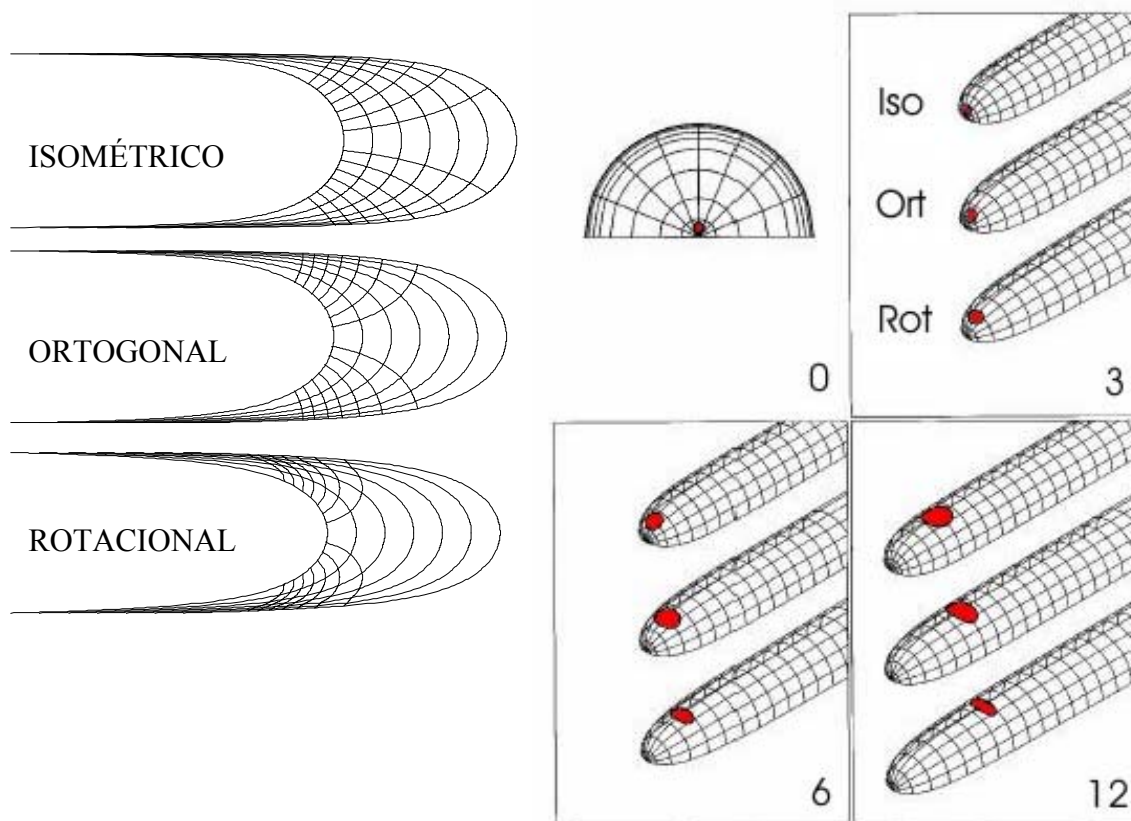


Figura 5. Esquemas de tres modos teóricos de expansión durante el crecimiento apical. En el lado izquierdo se muestra, en corte mediano longitudinal, las trayectorias teóricas de 14 puntos en la superficie de los hifoides, a medida que éstos crecen de izquierda a derecha. Las trayectorias fueron calculadas de acuerdo con los tres modos de expansión descritos en el texto. Los paneles del lado derecho se derivan de una secuencia animada tridimensional que se hizo para ver mejor las diferencias en el crecimiento espacial de los hifoides. El primer panel (0) es una vista frontal y aumentada de la punta del hifuido, donde inicialmente se trazó un pequeño círculo junto al polo apical. En los paneles siguientes se ve como el círculo se desplaza y deforma a medida que crecen los hifoides. (Para apreciar mejor los modos de expansión se recomienda verlos en movimiento en el sitio http://boyce3427.ucr.edu/current_publications.htm). Figura modificada de una publicación anterior (32).

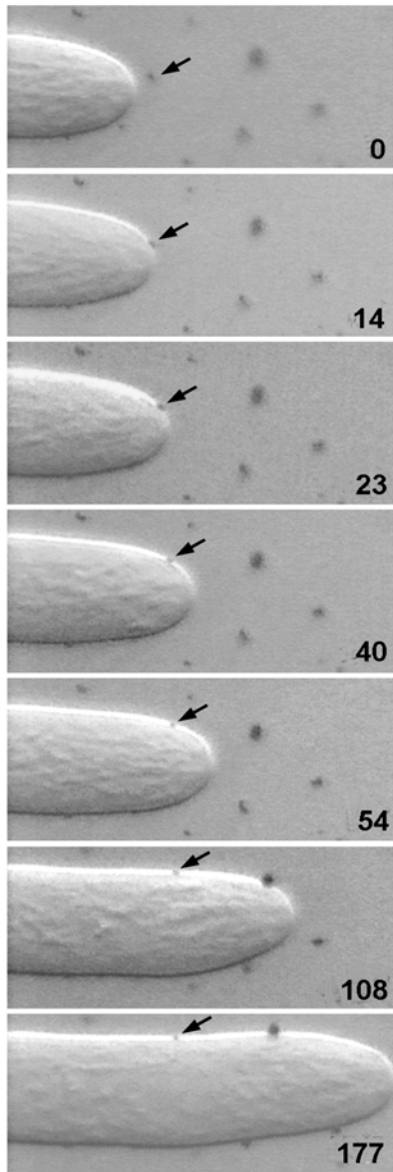


Figura 6. Movimiento de una partícula de carbón adherida a la punta de una hifa de *Rhizoctonia solani*. Los números son tiempos en segundos. La partícula se adhirió a los 14 segundos y las flechas indican su desplazamiento progresivo a medida que creció la hifa. Extraída de imágenes previamente publicadas (34).

El primer estudio a fondo sobre el crecimiento apical de las hifas fue hecho por Reinhardt en 1892 (35). Él trató de explicar, por medio de diagramas ortogonales, cómo debería transformarse la superficie de la punta para producir un tubo por crecimiento apical. Aunque estos diagramas se han reproducido frecuentemente en libros y artículos de fisiología de hongos, Reinhardt no dijo qué experimentos hizo para sostener sus ideas, simplemente escogió intuitivamente el patrón ortogonal descrito en otros estudios botánicos de la época. Más de un siglo después comprobamos que tenía razón (34).

Ecuación de la hifa en tres dimensiones (3D)

La evidencia experimental en favor del patrón ortogonal permitió completar la derivación matemática del modelo 3D, para lo cual se forzó a que todos los puntos de la superficie se desplazaran perpendicularmente al plano existente. Como resultado final se obtuvo una ecuación diferencial que se puede resolver numéricamente para darnos el perfil del hifoide ortogonal en el plano XY.

$$\frac{dy}{dx} = -\frac{1}{\sqrt{16\pi^2\left(\frac{V}{N}\right)^2(x^2 + y^2)(\sqrt{x^2 + y^2} + y^2) - x^2}}$$

Aunque esta expresión carece de la sencillez de la ecuación en 2D, ambas ecuaciones dan perfiles en el plano XY que son bastante parecidos,² y que en la práctica sería muy difícil de distinguir el uno del otro (32). Esta observación nos es muy provechosa pues justifica y revalida el uso del modelo 2D en los estudios de la morfogénesis mencionados anteriormente.

² Inclusive, en esta ecuación en 3D, los parámetros y variables utilizadas son iguales a los definidos para la ecuación en 2D.

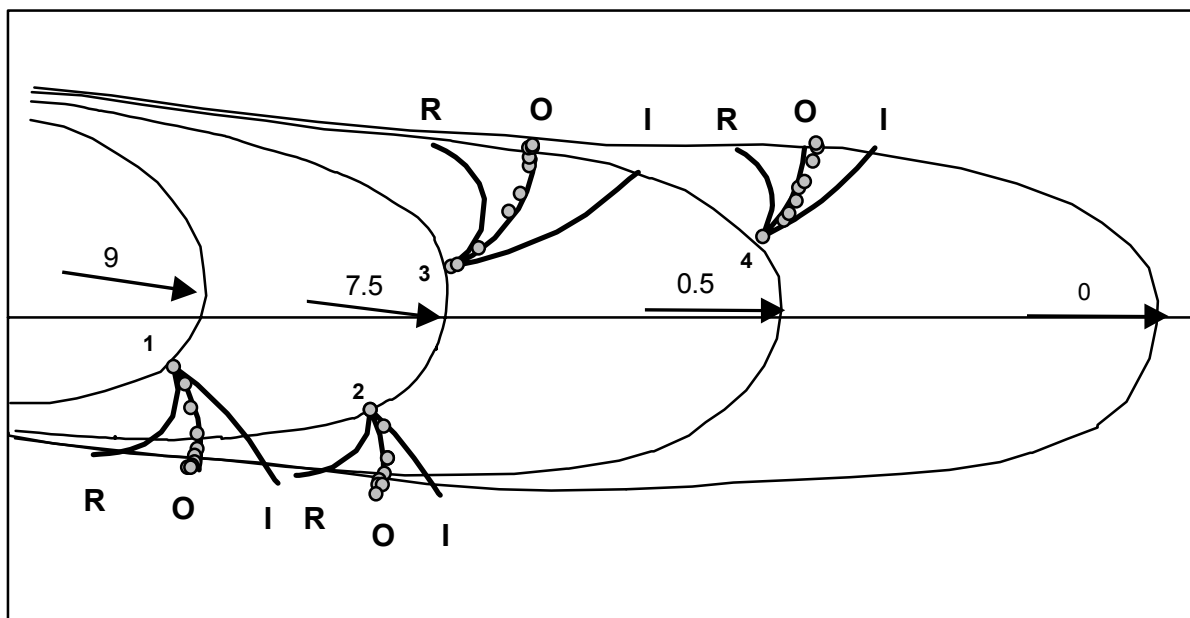


Figura 7. Análisis del desplazamiento de cuatro partículas de carbón adheridas a tiempos distintos a la superficie de la punta de una hifa de *Rhizoctonia solani*. La partícula # 1 se adhirió a los 0 segundos; las dos siguientes simultáneamente a los 58 segundos, y la # 4 a los 136 segundos. El último perfil celular se tomó a los 219 segundos. Cada partícula se rastreó a intervalos variables (círculos grises). La gráfica muestra las curvas teóricas de desplazamiento para cada partícula de acuerdo con los tres modelos de expansión: I = isométrico, O = ortogonal y R = rotacional. Durante el crecimiento hay cambios pequeños en el eje de crecimiento longitudinal (flechas) que se tienen que tomar en cuenta al hacer los cálculos correspondientes. Los valores indicados arriba de las flechas, muestran el ángulo relativo del eje de crecimiento con respecto al eje "x". Se ve claramente que el desplazamiento de las 4 partículas fue ortogonal. Tomado de una publicación anterior (34).

TERCERA LECCIÓN: En la ciencia, uno de los placeres más exquisitos es encontrar algo valioso sin haberlo buscado. Confirmación del papel de la turgencia en el crecimiento.

El descubrimiento de que la expansión de la hifa obedece a un patrón ortogonal nos lleva a la conclusión de que la presión osmótica interna es la fuerza física que expande a la pared celular del hongo. No sabemos que exista otro agente dentro de la célula que pudiese ejercer presión en dirección perpendicular a la superficie por toda la región de crecimiento, la cual incluye no sólo el ápice, sino también un buen trecho del subápice (25). Aún cuando el papel de la turgencia en la expansión de la pared celular estaba ya bien aceptado en la literatura, en años recientes se empezó a sugerir que no era la turgencia, sino el citoesqueleto, lo que ejercía la fuerza para dicha expansión (36, 37). Sin

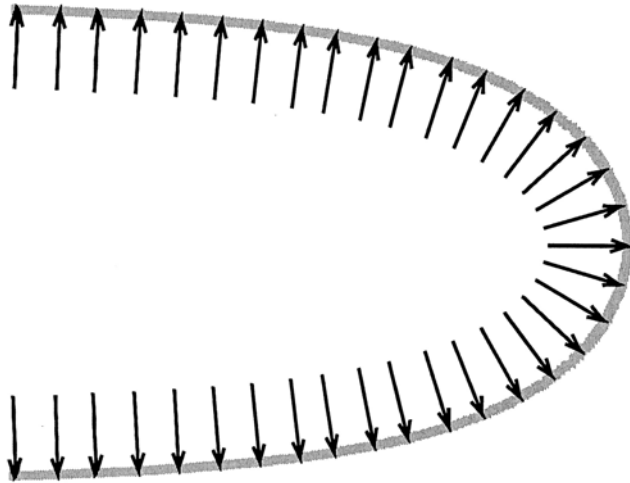


Figura 8. Representación vectorial esquemática de las fuerzas necesarias para que la pared se expanda ortogonalmente. Tomada de una publicación anterior (34).

haberlo buscado específicamente, los resultados del marcaje de la superficie de la hifa rechazan estas especulaciones que empezaban a cobrar fuerza en los círculos micológicos. Independientemente de que sería minúscula la presión que pudiese provenir del citoesqueleto de actina (38), no existe evidencia alguna de que el mismo esté orientado perpendicularmente a la superficie de la hifa para hacerlo responsable de la expansión ortogonal (Fig. 8).

Conclusión

La excursión teórico/práctica por el terreno de la morfogénesis descrita en este artículo nos lleva a la conclusión de que la forma tridimensional de una hifa la

determinan dos procesos: el patrón de descarga de vesículas y la turgencia. El primero es el responsable primario de que se produzca una forma tubular; el segundo, aunque esencial para que haya expansión de la pared, tiene un efecto pequeño en la forma final de la hifa. El modelo del CSV, tanto en dos como en tres dimensiones, nos explica cómo se genera el gradiente de crecimiento característico del crecimiento apical.

El modelo del CSV es una simplificación al máximo que nos señala cómo la célula podría derivar su morfología. El modelo nos permite hacer predicciones sobre la función de estructuras como el Spitzenkörper y de procesos como la presión osmótica interna. La ecuación hifoide sirve de punto de partida para hacer comparaciones cuantitativas y análisis morfométricos.

Puntos pendientes

¿Qué sigue? Ante todo, demostrar inequívocamente la validez de la hipótesis del CSV. No obstante la evidencia circunstancial a favor del modelo (24-26, 28, 29) quedan dos puntos claves por comprobar. Primero, verificar que en realidad el Spitzenkörper funciona como CSV. Se necesitan desarrollar técnicas para visualizar el tráfico de vesículas en células vivas y poder observar y medir la entrada y salida de vesículas en el Spitzenkörper. Segundo, determinar el mecanismo que hace avanzar al CSV. Tenemos evidencia preliminar de que el citoesqueleto microtubular está involucrado (24, 28), pero no se puede descartar que el movimiento del Spk sea mucho más complejo e incluya a otros componentes del citoesqueleto. Por ejemplo, se necesita definir bien los motores

moleculares que permiten que transiten las vesículas dentro de la célula, su especificidad y su regulación.

No hay que olvidar que el modelo del CSV es un ejemplo de reduccionismo fisiológico que extrae la esencia del proceso de biogénesis de la pared celular. La construcción de la pared fue reducida a su mínima expresión: la descarga de una vesícula representa una unidad de superficie celular. La realidad es que el proceso es bastante complejo e involucra cuando menos dos tipos de vesículas: los quitosomas (39) que son microvesículas que transportan al zimógeno de la quitina sintetasa y las vesículas de secreción convencionales, o macrovesículas (14) que acarrean otras enzimas y polímeros de pared prefabricados. El modelo no incluye la complejidad del ensamble de la pared celular (40). ¿Cómo es que los polímeros prefabricados más las enzimas que hacen las fibrillas se organizan *in situ* para ensamblar la pared celular? A pesar de que el proceso de fibrilogénesis de la quitina se puede reproducir *in vitro* (41), estamos muy lejos de conocer cómo se tejen estas fibrillas para dar una malla, que sin costura o desperfecto alguno, envuelve a la totalidad de la célula. Tampoco se sabe cómo es que las microfibrillas se integran a otros componentes de la pared celular, ni cómo la pared existente se reblandece para permitir la entrada de nuevos componentes y poder así incrementar la superficie celular sin aumentar su grosor. Queda mucho por conocer.....afortunadamente.

Referencias

1. Frey-Wyssling A, Muhlethaler K, Wyckoff RWG (1948). Microfibrillar structure of plant cell walls. *Experientia* 4:475 – 476.
2. Roelofsen PA (1959). *The Plant Cell Wall*. Gebruder Borntraeger, Berlin.
3. Castle ES (1938). Orientation of structure in the cell wall of *Phycomyces*. *Protoplasma* 31:331-345.
4. Roelofsen PA (1950). The origin of spiral growth in *Phycomyces* sporangiophores. *Rec Travaux Botaniques Neerlandais* 42:72–110.
5. Aronson JM, Preston RD (1960). An electron microscopic and x-ray analysis of the walls of selected lower Phycomycetes. *Proc Roy Soc B* 152:346–352.
6. Bartnicki-García S (1968). Control of dimorphism in *Mucor* by hexoses: inhibition of hyphal morphogenesis. *J Bacteriol* 96:1586-1594.
7. Bartnicki-García S (1981). Biochemical events and controls: Discussant's introduction. En: *The Fungal Spore: Morphogenetic Controls*. Turian G y Hohl HR. (Editores). Academic Press, Londres. 457-461.
8. Brody S (1973). Metabolism, cell walls, and morphogenesis. En: *Developmental Regulation*. Coward S. (Editor). Academic Press, New York. 107-154.
9. Bartnicki-García S (1996). The Hypha: unifying thread of the fungal kingdom. En: *A Century of Mycology*. Sutton B. (Editor). Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. 105-133.

10. Bartnicki-García S (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol* 42: 57-69.
11. Grove SN y Bracker CE (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *Journal of Bacteriology* 104: 989-1009.
12. Grove SN, Bracker CE y Morré DJ (1970). An ultrastructural basis for hyphal tip growth in *Pythium ultimum*. *Am J Bot* 57: 245-266.
13. Bartnicki-García S (1973). Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. En: *Microbial Differentiation*. Ashworth JM y Smith JE. (Editores). University Press. Cambridge, Reino Unido. 245-267.
14. Bartnicki-García S (1990). Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hyphal morphogenesis. En: *Tip Growth in Plant and Fungal Cells*. Heath IB. (Editor). Academic Press, San Diego. 211-232.
15. Heath IB (1994). The cytoskeleton in hyphal growth, organelle movements, and mitosis. En: *The Mycota, Vol. 1*. Wessels JGH y Meinhardt F. (Editores). Springer-Verlag, Berlin. 43-65.
16. Adebayo AA, Harris RF y Gardner, WR (1971). Turgor pressure of fungal mycelia. *Trans Brit Mycol Soc* 57: 145-151.
17. Bartnicki-García S y Lippman E (1969). Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science* 165: 302-304.
18. Bartnicki-García S y Lippman E (1977). Polarization of cell wall synthesis during spore germination of *Mucor rouxii*. *Exp Mycol* 1:230-240.
19. Bartnicki DD (1994). The design and implementation of computer simulation for fungal morphogenesis. Tesis de Maestría. University of California, Riverside. Riverside, California.
20. Bartnicki-García S, Hergert F y Gierz G (1989). Computer simulation of morphogenesis: mathematical basis for the hyphal tip growth. *Protoplasma* 153:46-57.
21. Girbardt M (1957). Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor*. *Planta* 50: 47-59.
22. Howard RJ (1981). Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J Cell Sci* 48: 89-103.
23. López-Franco R y Bracker CE (1996). Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi. *Protoplasma* 195:90-111.
24. Riquelme M, Reynaga-Peña CG, Gierz G y Bartnicki-García S (1998). What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol* 24:101-109.
25. Bartnicki-García S, Bartnicki DD y Gierz G (1995). Determinants of fungal cell wall morphology: the vesicle supply center. *Can J Botany* 73:S372-S378.
26. Bartnicki-García S, Bartnicki DD, Gierz G, López-Franco R y Bracker CE (1995). Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp Mycol* 19:153-159.

27. Bartnicki-García S y Gierz G (1993). Mathematical analysis of the cellular basis of fungal dimorphism. En: *Dimorphic Fungi in Biology and Medicine*. Van den Bossche H, Odds FC y Kerridge D. (Editores). Plenum Press, New York. 133-144.
28. Riquelme M, Gierz G y Bartnicki-García S (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology UK* 146: 1743-1752.
29. Reynaga-Peña CG, Gierz G y Bartnicki-García S (1997). Analysis of the role of the Spitzenkörper in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9096-9101.
30. Green PB (1991). Morphogenesis. En: *Plant Physiology. Growth and Development*. Vol X. Bidwell FC y Steward RGS. (Editores). Academic Press, San Diego. 1-64.
31. Koch AL (1994). The problem of hyphal growth in streptomycetes and fungi. *J Theor Biol* 171:137-150.
32. Gierz G y Bartnicki-García S (2001). A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. *J Theoret Biol* 208:151-164.
33. Castle ES (1958). The topography of tip growth in a plant cell. *J Gen Physiol* 41: 913-926.
34. Bartnicki-García S, Bracker CE, Gierz G, López-Franco R y Lu H (2000). Mapping the growth of fungal hyphae: Orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor. *Biophys J* 79: 2382-2390.
35. Reinhardt MO (1892). Das Wachstum der Pilzhyphen. *Jahrb Wissenschaft Bot* 23:479-566.
36. Money NP (1997). Wishful thinking of turgor revisited: the mechanics of fungal growth. *Fungal Gen Biol* 21:173 – 187.
37. Heath IB y Steinberg G (1999). Mechanisms of Hyphal Tip Growth: Tube Dwelling Amebae Revisited. *Fungal Gen Biol* 28:79-93.
38. Harold FM, Harold RL y Money NP (1995). What forces drive cell wall expansion? *Can J Botany* 73 S1:379-383.
39. Bracker CE, Ruiz-Herrera J y Bartnicki-García S (1976). Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 4570-4574.
40. Ruiz-Herrera J (1991). *Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
41. Ruiz-Herrera J y Bartnicki-García S (1974). Synthesis of cell wall microfibrils in vitro by a "soluble" chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *Science* 186: 357-359.



del Arenal Mena IP, Cea Bonilla A, Vázquez Contreras E, Riveros Rosas H (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVI**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2002).

(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

EDEMA CEREBRAL: MECANISMOS CELULARES DE CONTROL

Herminia Pasantes, Karina Tuz y Benito Ordaz

Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México

México, D.F., México.

hpasante@ifisiol.unam.mx

Introducción

La capacidad de mantener un volumen celular constante es una característica que se ha mantenido a través de la evolución, en prácticamente todas las especies. La preservación del volumen es un imperativo homeostático en la célula, ya que una variación en la concentración de iones y moléculas puede dar información equívoca en el sistema de señales que es la base de la función celular y de la comunicación intercelular. En condiciones fisiológicas la osmolaridad del medio extracelular está controlada con precisión. La presión coloido-osmótica de las macromoléculas intracelulares cargadas eléctricamente lleva a una entrada continua de Na^+ a la célula, que, sin embargo, no modifica el volumen celular debido a la función de la ATPasa de Na^+/K^+ . Esta situación puede cambiar en condiciones patológicas, en las que la osmolaridad del plasma se modifica, como en la hiponatremia, o en las que la actividad

de la ATPasa se ve afectada, como en la isquemia. En estos casos, ocurren cambios importantes en el volumen celular, que de no ser corregidos, tienen consecuencias muy graves para la célula y para el organismo en su conjunto. Por otra parte, en el curso de la actividad normal de la célula se generan microgradientes osmóticos que llevan modificaciones locales y transitorias en el volumen de estructuras intracelulares que deben, también, ser ajustadas. Tales cambios ocurren, por ejemplo, a consecuencia de la acumulación de nutrimentos, o en el curso de procesos de secreción y motilidad celular y durante la actividad sináptica.

Edema celular cerebral

El mantenimiento de un volumen constante es de particular importancia en las células nerviosas. Debido a las restricciones impuestas por la estructura rígida del cráneo a la expansión del tejido cerebral, el edema celular cerebral tiene consecuencias clínicas muy serias que van desde lesiones locales por ruptura vascular con la consecuente anoxia y muerte neuronal, hasta, en casos extremos, la muerte por paro respiratorio y cardíaco debido a la opresión de núcleos del tallo cerebral (1). El edema celular cerebral se presenta básicamente en dos tipos de situaciones: una, como resultado de la hiponatremia, asociada a diversos cuadros clínicos, durante la cual la osmolaridad del medio extracelular está modificada, es decir, es una condición en la que el edema se debe a una condición hiposmótica, que provoca la entrada de agua a las células para alcanzar el equilibrio osmótico. La otra, en la cual el edema ocurre como consecuencia de un incremento en la concentración intracelular de iones, seguida por agua para alcanzar el equilibrio osmótico, pero siempre en condiciones de osmolaridad externa constante.

La hiponatremia es la causa más común de edema cerebral celular (2, 3). Esta condición es consecuencia de un desbalance entre la ingesta y la excreción de agua y electrolitos. Este desbalance se presenta frecuentemente en condiciones de insuficiencia hepática o renal o por una deficiente secreción de la hormona antidiurética. También ocurre asociado a bajos niveles de glucocorticoides o mineralocorticoides, en el hipotiroidismo, así como por una excesiva ingesta de agua, como en la polidipsia psicótica. La hiponatremia y la consecuente aparición del edema celular cerebral es frecuentemente una consecuencia fatal de la infusión de soluciones hiposmóticas durante el tratamiento postoperatorio o por una corrección rápida de uremia por hemodiálisis excesiva. El edema celular cerebral es también la principal causa de los accidentes fatales en consumidores de la droga "éxtasis". Un estado crónico de hiponatremia se presenta normalmente durante el embarazo y es frecuente en los ancianos.

El edema celular cerebral isosmótico ocurre en condiciones de osmolaridad plasmática normal en patologías asociadas a hiperamonemia, como la encefalopatía hepática y más frecuentemente en condiciones de epilepsias, isquemia y de traumatismo craneoencefálico (2, 3). En este último caso, es imperativo controlar el edema cerebral para evitar la muerte por paro cardíaco o respiratorio, como ya se mencionó. En general, cualquier patología que conlleve una situación de estrés

oxidativo, particularmente la lipoperoxidación de las membranas, tiene el riesgo de resultar en edema celular, debido a una sobrecarga iónica a través de las membranas deterioradas.

El abordaje para el estudio del cambio en volumen en los dos tipos de situaciones, edema hiposmótico y edema isosmótico, es necesariamente distinto ya que, además de la notable diferencia en los mecanismos que originan el edema en cada caso, parece haber también diferencias importantes en cuanto a la respuesta celular. En el primer caso, el del edema hiposmótico, el incremento en el volumen celular se produce simplemente por la entrada de agua y las células responden con la expulsión de osmolitos intracelulares y agua, hasta que se alcanza el equilibrio osmótico y el volumen celular se recupera. El conocimiento en detalle de los mecanismos que permiten esta movilización, permitiría hacer más eficiente el proceso así como, evitar posibles interferencias con el proceso de rescate del volumen celular. En el segundo caso, por el contrario, el mecanismo que origina el edema es precisamente la entrada de solutos osmóticamente activos, acompañados de agua, por lo que, para contrarrestar el edema, la eficiencia de los mecanismos de expulsión de los osmolitos intracelulares, debería ser mayor que la de su entrada. Mientras que muchos de los aspectos de la regulación del volumen en la situación hiposmótica se conocen bien y han sido muy estudiados durante varios años, los posibles mecanismos para regular el incremento en volumen en condiciones isosmóticas se conocen escasamente. Es incluso posible que las células no tengan la capacidad de contrarrestar activamente el edema impuesto, y por ello, los esfuerzos para evitar las consecuencias negativas del edema isosmótico deben dirigirse a conocer los mecanismos que permitan prevenirlo, más que a tratar de hacer más eficientes los compensatorios.

Regulación del volumen celular cerebral en el edema hiposmótico

En estudios *in vivo*, en condiciones de hiponatremia crónica, la primera respuesta adaptativa que se observa es un desplazamiento compensatorio de líquido del espacio intersticial al cefalorraquídeo, y, posteriormente, a la circulación sistémica. Más adelante ocurre la movilización de osmolitos intracelulares, inicialmente K^+ y Cl^- , cuyos niveles disminuyen en las primeras 3-6 horas, seguido de una disminución gradual, pero constante y persistente, de los niveles celulares de osmolitos orgánicos tales como mio-inositol, fosfocreatina/creatina, glicerofosforilcolina, así como algunos de los aminoácidos más abundantes: glutamato, glutamina, taurina y glicina (4). El exceso de agua celular se corrige simultáneamente a estos cambios en los osmolitos y permanece dentro de niveles normales. Mientras que la concentración intracelular de los electrolitos se restaura con rapidez a pesar de que persista la condición de hiponatremia, la de los osmolitos orgánicos se mantiene disminuida, indicando que es a través de estas moléculas que se lleva a cabo la regulación crónica del volumen celular en el cerebro. En particular, los niveles de taurina permanecen bajos en tanto persista la condición de hiponatremia.

Este manejo distinto de los osmolitos sugiere que la movilización de los electrolitos es una respuesta de emergencia celular, pero que puede ser potencialmente perjudicial en el cerebro, dado el papel clave que los iones desempeñan en el control de la excitabilidad neuronal. A largo plazo, el mantenimiento del volumen celular en el cerebro está a cargo de los osmolitos orgánicos, en particular la taurina. Este aminoácido, que no forma parte de las proteínas, tiene además la ventaja de su inercia metabólica, lo que le permite movilizarse dentro y fuera de la célula sin afectar ninguna de las funciones o reacciones metabólicas celulares.

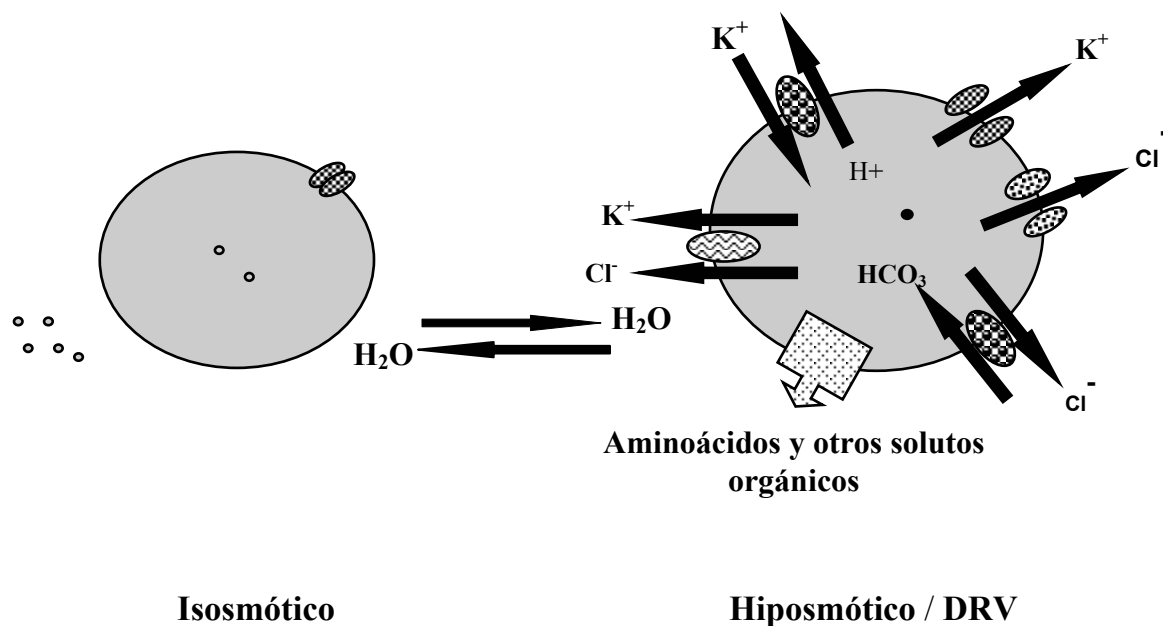


Figura 1. El proceso de ajuste de volumen se lleva a cabo a través de la modificación en la concentración de solutos intracelulares osmóticamente activos, que se reduce en condiciones hiposmóticas eliminando de la célula el agua osmóticamente obligada. La salida de los solutos puede ocurrir a través de canales, transportadores e intercambiadores.

El conocimiento en detalle de los mecanismos básicos de la regulación del volumen celular cerebral se ha llevado a cabo utilizando cultivos primarios de neuronas y astrocitos. Esta preparación tiene múltiples ventajas, entre ellas el poder contar con una población celular homogénea, y una mayor facilidad para estudios de perfil farmacológico. Al exponer a las células nerviosas a un medio externo hiposmótico, inicialmente responden como osmómetros perfectos, incrementando su volumen, pero casi inmediatamente se inicia un proceso de regulación activa que ocurre a través de la expulsión de osmolitos intracelulares, junto con agua (Fig. 1) (3). La eficiencia de

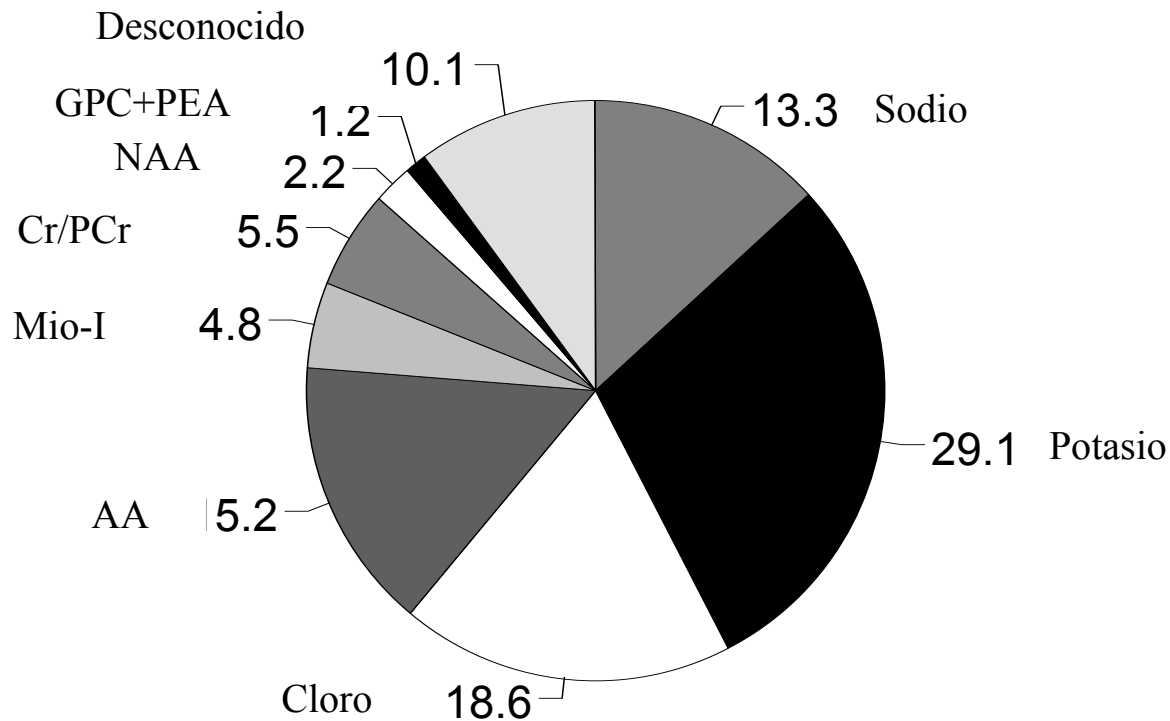


Figura 2. Contribución de los osmolitos orgánicos e inorgánicos a la regulación del volumen en el cerebro en condiciones de hiponatremia crónica (Tomado de 4).

esta respuesta adaptativa varía en las distintas células, siendo mayor en los astrocitos que en las neuronas (5). Los osmolitos que participan en esta recuperación del volumen son, al igual que en el cerebro *in vivo*, los iones intracelulares que se encuentran en mayor concentración, que son el K^+ y el Cl^- , así como un grupo de moléculas orgánicas (Fig. 2). Muchas de las características de este proceso de regulación en células nerviosas se han definido por el trabajo de nuestro laboratorio (5-9). Uno de los aspectos que más nos ha interesado es el de señalar la importancia y la contribución de los osmolitos orgánicos, en particular los aminoácidos, en los mecanismos adaptativos que permiten a las células nerviosas controlar su volumen ante un decremento en la osmolaridad externa, con la consecuente entrada de agua tendiente a restaurar el equilibrio osmótico (10). Hemos caracterizado la vía de movilización de los aminoácidos, generalmente considerando a la taurina como representativo de este grupo de osmolitos, y probamos que se trata de un mecanismo difusional, sin ninguna relación con el transportador dependiente de energía, y que funciona llevando a cabo la acumulación de los aminoácidos al interior celular (11, 12). Establecimos el perfil de sensibilidad farmacológica de la vía de movilización de la

taurina habiendo encontrado que es muy similar a la que moviliza el cloro, que es uno de los osmolitos más importantes durante la regulación del volumen (13). Estos resultados han dado sustento a considerar una vía común de translocación de Cl^- , aminoácidos y otros osmolitos orgánicos, activada por volumen.

La identificación molecular de la(s) vía(s) que movilizan a los aminoácidos y al cloro durante la regulación del volumen celular no se ha concretado, a pesar de que existen ya numerosos canales de Cl^- clonados, algunos de los cuales incluso son sensibles a hiposmolaridad (14). Sin embargo, ninguno de ellos reúne las características típicas del canal que se activa durante la regulación del volumen. En cuanto al canal de K^+ activado por volumen, se ha considerado la posibilidad, con base en un reporte reciente, de que se trate de un subtipo de los canales de la familia Task (15). La identificación de este canal es importante ya que es precisamente la salida del K^+ el proceso que limita la eficiencia del proceso regulador del volumen en condiciones hiposmóticas. Es interesante señalar que en las células epiteliales, el incremento en volumen activa canales de K^+ dependientes de Ca^{+2} , pero no se trata en sí de un canal sensible a volumen, sino de una respuesta al incremento en Ca^{+2} citosólico, que generalmente acompaña al aumento en el volumen celular (16).

Señales de transducción

El proceso de regulación del volumen implica varias etapas: la inicial es aquella en la que la célula debe detectar el cambio en volumen, para posteriormente desencadenar un sistema de señales que llevan a la activación de los efectores; en este caso, los osmolitos que ajustan el contenido de agua. Finalmente, la célula debe "recordar" su volumen inicial y desactivar los mecanismos reguladores, ya sea por el silenciamiento de las señales transductoras o por la desactivación de los canales a través de los cuales permean los osmolitos. Hasta este momento, no se han identificado los sistemas o moléculas que pudieran funcionar como sensores para el volumen en ningún tipo celular. En cuanto a las señales de transducción, los resultados son todavía poco claros. El incremento en volumen está asociado, en la mayor parte de las células, con un aumento en los niveles citosólicos de Ca^{+2} (16), por lo que se consideró a este cation como un elemento clave para el proceso de transducción. Sin embargo, numerosas investigaciones (revisadas en 16) han demostrado claramente que el Ca^{+2} sólo participa como señal en aquellas células, generalmente de tipo epitelial, en las que el canal de K^+ que participa en la regulación del volumen es un canal dependiente de Ca^{+2} . En células no epiteliales, incluyendo las células nerviosas, el incremento en la concentración de Ca^{+2} parece ser sólo un epifenómeno, no vinculado directamente con los mecanismos de regulación del volumen. El cambio en volumen y su subsecuente recuperación son fenómenos complejos que involucran numerosos cambios celulares que pueden estar o no, asociados directamente con la activación de los osmolitos, tales como reacciones de estrés, la reorganización del citoesqueleto necesaria para ajustar tanto el cambio inicial en el volumen celular como su ajuste posterior y las reacciones de adhesión, vinculadas con el cambio en el volumen y su recuperación.

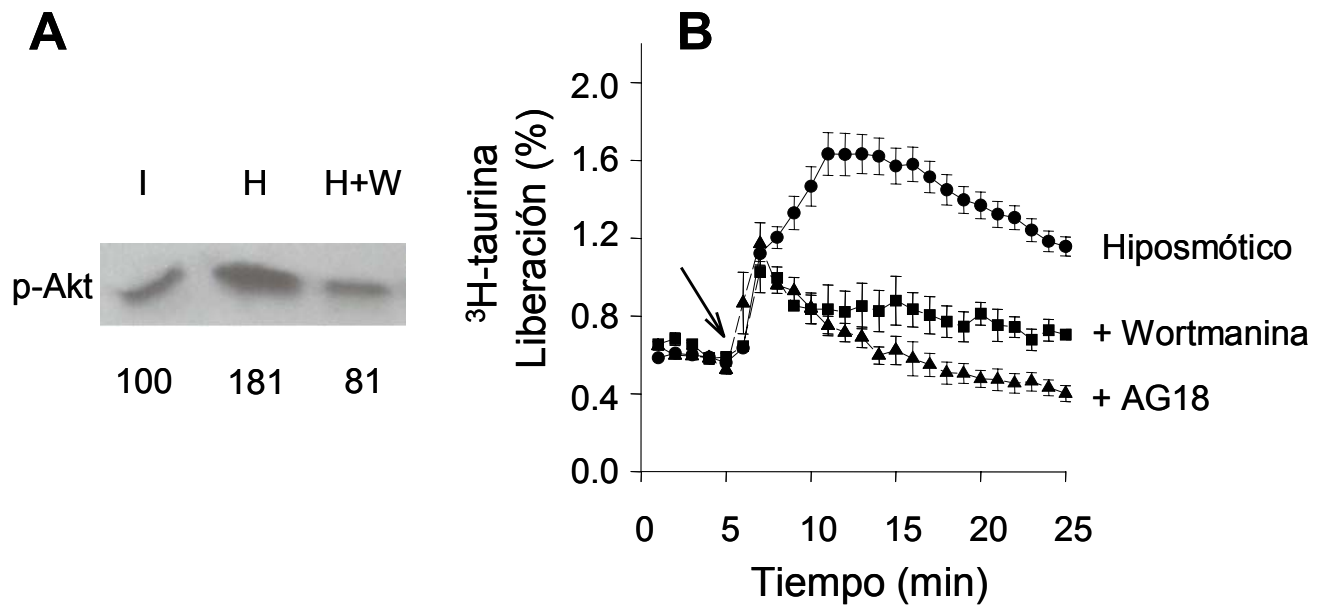


Figura 3. Participación de PI3K y tirosinas cinasas en la liberación de ^3H -taurina sensible a hiposmolaridad en rebanadas de hipocampo de rata. **A.** Western blot que muestra la actividad de PI3K cuantificada por la detección de la forma fosforilada de Akt, enzima cuya fosforilación ocurre casi exclusivamente por la actividad de PI3K. (I) control, (H) hiposmótico 30% y (H+W) hiposmótico + el inhibidor de PI3K, wortmanina. **B.** Curso temporal de la liberación de ^3H taurina. Las células con el trazador radioactivo incorporado se profundieron con medio isosmótico durante 5 min, (●) y a continuación (flecha) con un medio hiposmótico 30% (■), o con un medio hiposmótico conteniendo wortmanina 100 nM (▲), o el inhibidor general de tirosinas cinasas, AG18 50 μM . Datos extraídos de Franco *et al.* (18).

Recientemente se ha puesto énfasis en la participación de cinasas de tirosina como elementos clave en la recuperación del volumen celular, como resultado del efecto de inhibidores de estas enzimas, como la tirfostina (AG18) que reduce de manera muy importante la movilización de los osmolitos y previenen, por tanto, la recuperación del volumen (Fig. 2). Aunque las enzimas específicas involucradas no se han identificado, se sabe que una enzima blanco de las tirosin-cinasas, la cinasa de fosfoinositidos (PI3K), tiene un papel clave en la movilización de taurina y Cl^- en respuesta al incremento al volumen. La PI3K se activa por hiposmolaridad y los bloqueadores de su actividad, como la wortmanina y el LY294002 son muy eficientes inhibidores de la movilización osmosensible de taurina y Cl^- (Fig. 3) (17, 18). La investigación acerca de las conexiones y la jerarquización de estas cinasas de tirosina y sus efectores, hasta llegar a la activación de las vías de translocación de los osmolitos es un tema que está siendo investigado muy activamente.

Regulación isovolúmica

Los modelos experimentales en los que se han realizado la mayor parte de las investigaciones sobre la regulación del volumen celular, implican cambios drásticos y súbitos en la osmolaridad externa. Aún cuando estos protocolos pueden ser muy útiles para amplificar las reacciones del proceso para su estudio, no reflejan estrictamente lo que sucede en condiciones fisiológicas y, aún, patológicas, en las que los cambios en la osmolaridad externa son pequeños y escalonados. Por ello, se ha diseñado un modelo experimental en el que el cambio en la osmolaridad se lleva a cabo en forma gradual, simulando más adecuadamente lo que ocurre en condiciones de hiponatremia. En trabajos de nuestro laboratorio utilizando este modelo hemos detectado que en estas condiciones no hay un cambio efectivo en el volumen celular, de ahí la denominación de "isovolúmico" para este proceso. Sin embargo, nuestros experimentos han demostrado que se trata de un mecanismo de corrección activo, que involucra la movilización de osmolitos, de manera similar a como ocurre en el modelo de cambio súbito en osmolaridad, pero con diferencias que enfatizan la importancia de los osmolitos orgánicos y la taurina en particular, como osmolitos de elección (Fig. 4-6) (19). En estas condiciones, el umbral de activación de salida de la taurina es muy bajo, ya que ocurre ante una disminución en la osmolaridad de sólo 18 mOsm (Fig. 4), y su movilización es mayor que la de otros aminoácidos, lo que hablaría de su papel preponderante en los mecanismos de regulación de volumen en condiciones más parecidas a las que ocurren *in vivo*. La movilización de Cl^- y de K^+ requiere decrementos en osmolaridad mayores que en el caso de la taurina (Fig. 5-6)

Consecuencias y riesgos de la corrección rápida de situaciones de hiponatremia

El procedimiento usado comúnmente para corregir la hiponatremia es la administración de una solución salina hipertónica, aunque la restricción en la ingesta de líquidos es la opción aconsejable en los casos de hiponatremia asociada a falla en la secreción de la hormona antidiurética. El proceso de corrección debe, sin embargo, hacerse en forma lenta y controlada, ya que, debido a los cambios adaptativos que se han descrito, la osmolaridad celular está ahora en equilibrio con un medio externo hiposmótico. Al hacer la corrección restableciendo la normonatremia, la célula percibe al plasma normal como una condición hiperosmótica y activa los mecanismos de regulación tendientes a restablecer el nuevo equilibrio, con la consiguiente deshidratación. Es posible que esta respuesta sea la responsable de la consecuencia más grave de una corrección inadecuada de la hiponatremia; la mielinólisis que ocurre en distintas regiones del cerebro, en particular en el tallo cerebral. Esta patología, cuyas características son cuadriplegia flácida, parálisis respiratoria, letargo y coma, podría derivarse de una ruptura de las uniones comunicantes en los elementos de la barrera hematoencefálica a consecuencia de la deshidratación, permitiendo el acceso de factores que puedan causar daño a los oligodendrocitos y llevando finalmente a la destrucción de la mielina (20).

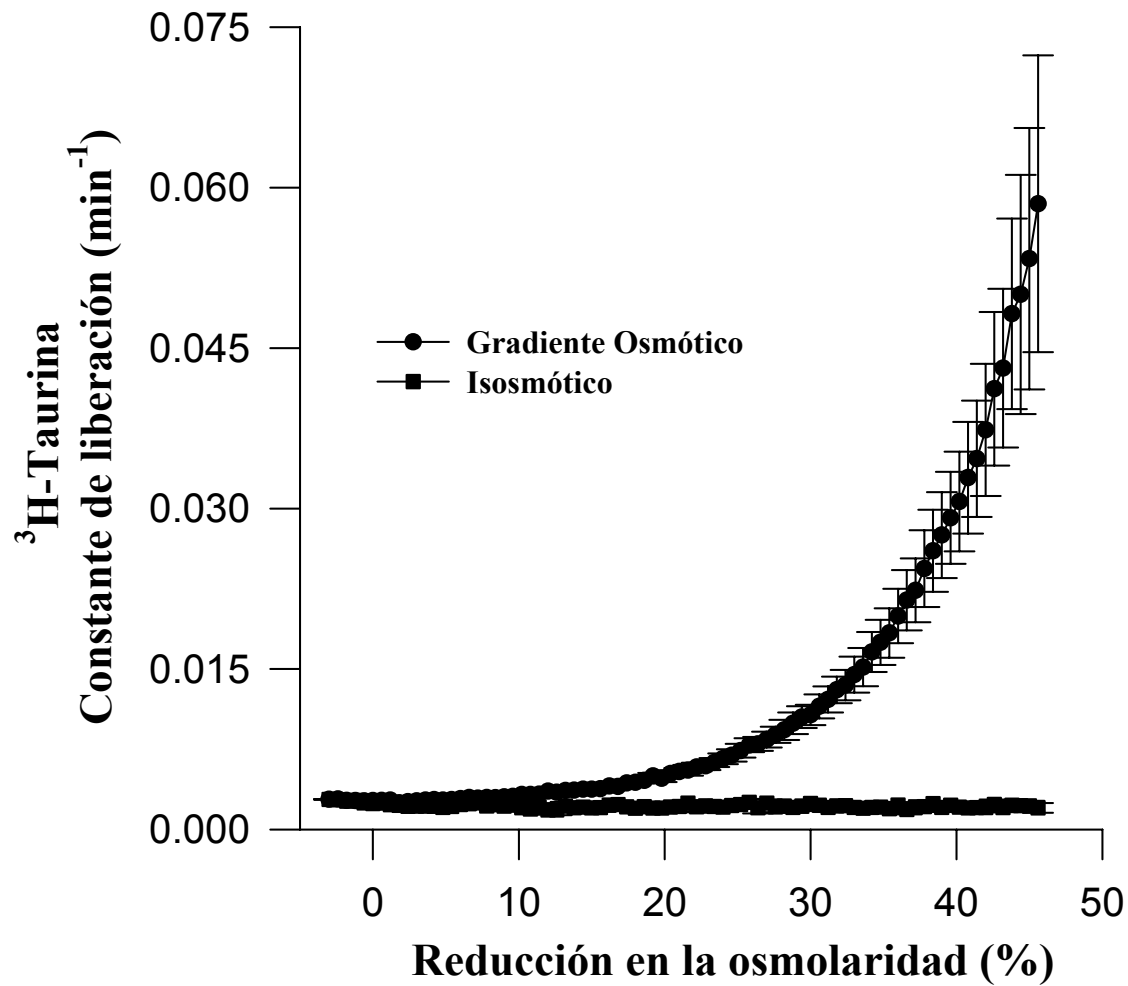


Figura 4. Curso temporal de la liberación de taurina inducida por un gradiente osmótico en neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo. Las células se incubaron con ³H-aurina durante 30 min y se perfundieron a una velocidad de 2 ml /min con un gradiente osmótico de -1.8 mOsm/min, (■) formado al mezclar continuamente un medio hiposmótico (50%) con un medio isosmótico. Paralelamente se midió la liberación de ³H-aurina en un medio isosmótico, como control (●).

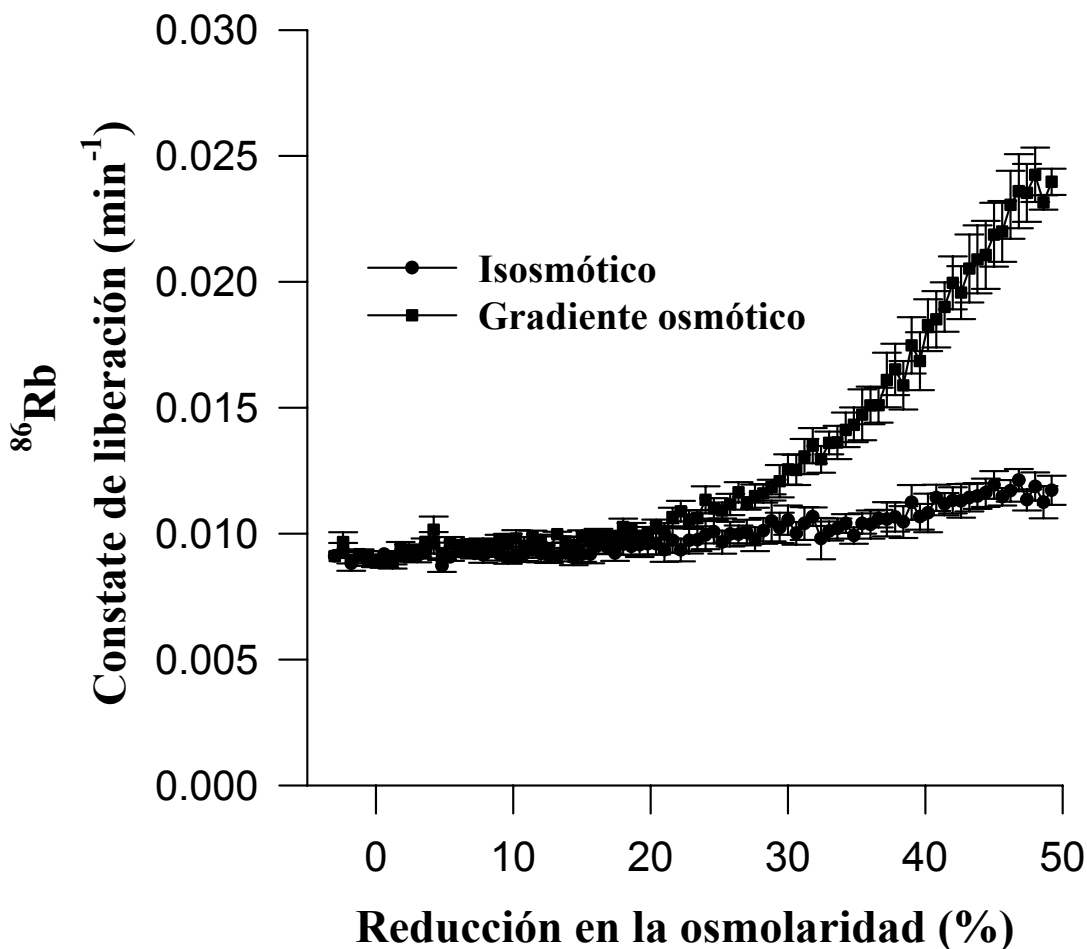


Figura 5. Curso temporal de la liberación de ⁸⁶Rb (como trazador de K⁺) inducida por un gradiente osmótico. Las condiciones experimentales y los símbolos son como se describe en la Fig. 4.

Edema Isosmótico.

El edema isosmótico es un componente importante del daño cerebral en patologías como la isquemia, las epilepsias, la encefalopatía hepática y el trauma craneoencefálico. Los mecanismos que generan el edema son diferentes en cada caso. Durante la isquemia, por ejemplo, la baja en la carga energética lleva a la acumulación intracelular de Na⁺, que es seguida por la entrada de Cl⁻ y agua. Como consecuencia de la despolarización inducida por la entrada de Na⁺, se genera una liberación excesiva de K⁺ y de aminoácidos excitadores. Estas dos condiciones son, a su vez, generadoras de una nueva fase de edema, con lo que el daño entra en una cadena autopropagada de despolarización y excitotoxicidad que causa nuevos episodios de muerte neuronal, impidiendo la recuperación del área isquémica perifocal. Además, la liberación del

ácido araquidónico, así como la presencia de oxígeno durante la reperfusión, generan un cuadro de lipoperoxidación de las membranas causando una sobrecarga iónica a través de las membranas deterioradas, que lleva a nuevas situaciones de edema y a una entrada de Ca^{+2} , causante de muerte neuronal (2, 3, 21, 22).

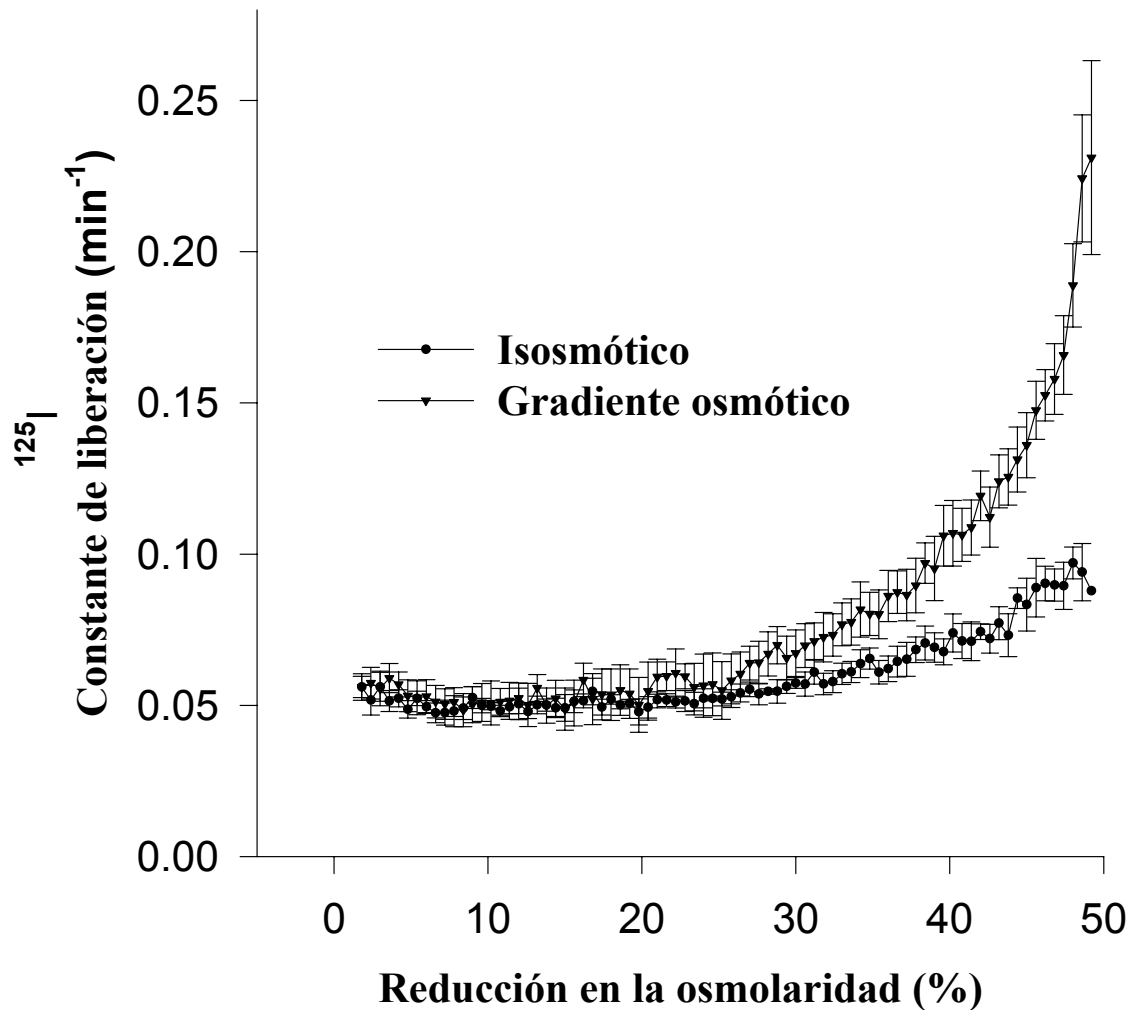


Figura 6. Curso temporal de la liberación de $^{125}\text{I}^-$ (como trazador de Cl^-) inducida por un gradiente osmótico. Las condiciones experimentales y los símbolos son como se describe en la Fig. 4.

En el caso de las epilepsias, la hiperexcitabilidad neuronal incrementa las concentraciones de K^+ extracelular, que es acumulado por los astrocitos, junto con Cl^- y agua osmótica, produciéndose el edema. En el caso de los traumatismos craneoencefálicos, la causa del edema no es muy clara, pero podría deberse por una parte a la producción de lactato o por otra, al daño membranal y la generación de especies

reactivas de oxígeno, lo que llevaría a una serie de reacciones en cadena autopropagadas, perpetuando el daño membranal, con la consiguiente sobrecarga iónica y acumulación de Ca^{+2} intracelular, todo ello causante de sucesivos episodios de edema y muerte celular.

No se ha investigado la existencia de posibles mecanismos de regulación de volumen en condiciones de edema isosmótico. Sin embargo, puede predecirse que, en estas condiciones, el papel regulador a cargo de los iones no esté funcionando, ya que es precisamente la entrada de éstos lo que genera el edema. Sin embargo, la contribución de los aminoácidos y de otros osmolitos orgánicos, puede reducir el edema, o, al menos, atenuar su magnitud.

Puesto que la activación de un proceso regulador similar al que ocurre en el edema hiposmótico es poco factible, las estrategias para prevenir el edema isosmótico deben dirigirse a su prevención, más que a una eventual corrección por parte de las células. Ya que el Cl^- , es siempre un factor común causal del hinchamiento en condiciones isomóticas, estas estrategias deben considerar la posibilidad de evitar la entrada de Cl^- . Para ello, es imprescindible conocer con detalle las características de los procesos de traslocación de este anión en cada una de las patologías que generan el edema isosmótico.

Referencias

1. Kimelberg HK (1995) Current concepts of brain edema. *J Neurosurg* 83: 1051-1059.
2. Kimelberg HK y Ransom BR (1986) Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling. En: Fedoroff S y Vernadakis A (eds). *Astrocytes*. Academic Press, Florida. 129-166.
3. McManus ML y Churchwell KB (1994) Clinical significance of cellular osmoregulation. En: Strange K (ed). *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. CRC, Boca Ratón Florida. 63-74.
4. Verbalis JG y Gullans SR (1991) Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res* 567: 274-282.
5. Pasantes-Morales H (1996) Cell volume regulation in brain cells: Cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Disease* 11: 187-204.
6. Pasantes-Morales H, Maar T y Morán J (1993) Cell volume regulation in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 34: 219-224.
7. Pasantes-Morales H, Chacón E, Murray RA y Morán J (1994) Properties of osmolyte fluxes activated during regulatory volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 37: 720-727.
8. Pasantes-Morales H, Murray RA, Lilja L y Morán J (1994) Regulatory volume decrease in cultured astrocytes: I. Potassium and chloride activated permeability. *Am J Physiol* 266: C165-C171.

9. Pasantes-Morales H, Murray RA, Sánchez-Olea R y Morán J (1994) Regulatory volume decrease in cultured astrocytes: II. Activated permeability to amino acids and polyalcohols. *Am J Physiol* 266: C172-C178.
10. Pasantes-Morales H, Alavéz S, Sánchez-Olea R y Morán J (1993) Contribution of organic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res* 18: 445-452.
11. Schousboe A, Sánchez Olea R, Morán J y Pasantes-Morales H (1991) Hyposmolarity induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high affinity transport. *J Neurosci Res* 30: 662-665.
12. Sánchez-Olea R, Morán J, Schousboe A y Pasantes-Morales H (1991) Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci Lett* 130: 233-236.
13. Sánchez-Olea R, Morales-Mulia M, García O y Pasantes-Morales H (1996) Chloride channel blockers and polyunsaturated fatty acids similarly inhibit the volume activated pathways for Cl and taurine in cultured cerebellar granule neurons. *Am J Physiol* 270: C1703-C1708.
14. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F y Zdebik AA (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82(2): 503-68.
15. Niemeyer MI, Cid P, Barros F y Sepúlveda F (2001) Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K⁺ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *J Biol Chem* 276 (46): 43166-74.
16. Pasantes-Morales H y Morales-Mulia S (2000) Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron* 86: 414-427.
17. Morales-Mulia S, Cardin V, Torres-Marquez M, Crevenna A y Pasantes-Morales H (2001). Influence of protein kinases on the osmosensitive release of taurine from cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 38: 153-161.
18. Franco R, Torres-Marquez M y Pasantes-Morales H (2001) Evidence for two mechanism of aminoacid osmolyte release from hippocampal slices. *Pflugers* 442: 791-800.
19. Tuz K, Ordaz B, Vaca L, Quesada O y Pasantes-Morales H (2001) Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 79: 1-10.
20. Baker EA, Tian Y, Adler S y Verbalis JG (2000) Blood-brain barrier disruption and complement activation in the brain following rapid correction of chronic hyponatremia. *Exp Neurol* 165: 221-230.
21. Tibor K y Siesjö BK (1997) Changes in ionic fluxes during cerebral ischemia. *Int Rev Neurobiol* 40: 27-45.
22. Stoll G, Jander S y Schroeter M (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progr Neurobiol* 56: 149-171.



Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez-Contreras E, (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVI**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2002).

(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

IMÁGENES DEL CONOCIMIENTO

Guía para comprender, construir, diseñar, leer, utilizar, y si es posible entusiasmarse con los Mapas Conceptuales y de paso con la tecnología (o el *Homo sapiens* conoce al *Homo videns* y se ponen de acuerdo)

Manuel Fco. Aguilar Tamayo

Asesor pedagógico del Campus REDMESO Virtual (www.redmeso.net/campus) de la Red Mesoamericana de Recursos Bióticos en su sede del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

cibertlan@yahoo.com

Introducción y advertencias al lector

Este documento se presenta en dos partes, en la primera de ellas se dan a conocer algunas reflexiones que ayudan a poner en contexto la actividad docente y la actitud de éste frente a las tecnologías de la información y comunicación. Esto con el objetivo de llegar a imaginar aplicaciones y estrategias dirigidas a mejorar o diversificar la intervención pedagógica y facilitar el aprendizaje de los alumnos.

La segunda parte es una *guía para el diseño y elaboración de mapas conceptuales*. En esta guía se presentan los argumentos psicopedagógicos con respecto a la elaboración de los mapas conceptuales, así como experiencias de su uso y se proponen además como un *pretexto* y herramienta que permita hacer un uso de

las computadoras más allá de almacenes inertes de información. Las propuestas específicas o aplicaciones dependerán de los intereses de cada uno de los lectores. En este texto se “insinúan” algunas otras posibilidades; otras más serán también imaginadas, producto del propio interés de los lectores.

PRIMERA PARTE : HAGA “CLIC” PARA CONTINUAR O PRESIONE “ESC” PARA SALIR.

ESTRATEGIAS PARA ENTRAR Y SALIR DE INTERNET Y LAS TECNOLOGÍAS

Las siguientes líneas se dirigen a dos tipos de docentes, los dos imaginarios y un poco esquematizados para el beneficio de la redacción de este texto. Uno de nuestros imaginarios docentes es aquél que es huido acerca de aprender nuevas cosas, que se escabulle para no verse frente a la computadora y que posee un arsenal de justificaciones para mantenerse alejado de lo nuevo, porque siempre los tiempos pasados son mejores. El otro docente es el lector de este texto, dispuesto a discutir, debatir, escuchar, opinar y sobre todo, a aprender y enseñar.

El tema de las nuevas tecnologías y su aplicación en la enseñanza y el aprendizaje se presenta para el docente como ineludible, no porque su labor dependa directamente de dichas tecnologías, sino porque son parte de la realidad de sus aprendices, una relación pedagógica que ignore el contexto del *otro* tiene pocas expectativas de éxito.

Tecnología y aparatos electrodomésticos

La *civilización occidental*, se caracteriza entre otras cosas, por su capacidad *acumulativa* y *generalizable* de las experiencias, los conocimientos, la técnica y la tecnología. La *acumulación de conocimiento y su aplicación para transformar y construir cosas* se denomina progreso. Sin entrar al debate de los *beneficios del progreso* y si esa carrera acumulativa es *negativa* o *positiva* para la humanidad, algunas de sus expresiones materiales han transformado nuestra cotidianidad y cultura.

La licuadora o la televisión son máquinas que definen en parte lo que *somos* y *hacemos* todos los días; de igual forma, se pueden considerar muchos otros inventos y artefactos: Videocaseteras, aparatos reproductores de DVD, CD, MP3, entre otros y sin olvidar, por supuesto, la computadora personal. Todos los artefactos mencionados tienen características y funciones que superan y/o se adicionan a modelos anteriores. Algunas de las *nuevas versiones* introducen cambios radicales, sin embargo, la mayoría de los cambios son *versiones* de las anteriores: cada uno de los aparatos ha *acumulado y condensado las funcionalidades y características* de los anteriores. (1)

La *innovación* requiere de lo *anterior*, es un producto histórico que requiere ser comparado con algo similar. De no existir referente, el artefacto u objeto en vez de ser

identificado como innovador o novedoso, pasaría a ser algo incomprensible o carente de significado o interés.

¿Cómo funciona esto?

Los seres humanos poseemos la capacidad de *aprender*. Algunas veces, nuestros aprendizajes son integrados a un sistema que conecta con *otros aprendizajes*. En algunos otros casos los aprendizajes dependen o son facilitados por aprendizajes previos. Resultado del *proceso de aprendizaje* son los *conocimientos* que tenemos sobre las cosas: algunos conocimientos nos parecen tan obvios, básicos o necesarios que perdemos conciencia de que algunas vez tuvimos que esforzarnos para *aprender* y obtener los *conocimientos* que utilizamos y aplicamos para resolver problemas.

El uso de diversos objetos cotidianos lleva implícitos aprendizajes de los cuales no siempre somos conscientes; por ejemplo, el saber que antes de hacer funcionar la más rudimentaria televisión hasta la más sofisticada pantalla, los aparatos deben estar *conectados* a la corriente eléctrica. Este conocimiento es generalizable a todos los aparatos electrónicos y *eléctricos* (obviamente). No importa que nos pongan frente a mil modelos de televisión, un conocimiento adquirido, básico e importante es que necesitan corriente eléctrica, el segundo conocimiento es que puede ser *encendido* y *existe un interruptor* para hacerlo, conocimiento fundamental para poder *tener la intención* de encenderlo. Probablemente, si se tratara de un modelo extraño nos tardaríamos un poco en encontrar el “botón” para ponerlo a funcionar, pero de no saber que existe el “botón” simplemente no tendríamos ninguna *estrategia* para llegar a *aprender cómo se enciende*.

¿Qué más cosas hace?

Existen situaciones que exigen aprendizajes, y entonces aprendemos como una forma de adaptación para mantener el trabajo, o para superar determinada circunstancia. Hay aprendizajes que se hacen por interés hacia un determinado tema, y aprendizajes “a fuerza” porque de ellos depende una calificación escolar. Pero todos ellos son, de alguna forma necesarios y nos ayudan a alcanzar o cumplir objetivos. Todo aprendizaje es parte de un contexto y no siempre el individuo es consciente de que aprende, la *conciencia del propio aprendizaje* permite aprendizajes más complejos, de ahí el interés de reflexionar acerca de nuestros propios aprendizajes (2).

¿Conocemos todas las funciones de nuestra videocasetera? ¿hacemos algo distinto en la última versión de *Microsoft Word XP* que cuando usábamos hace unos 12 años el *Microsoft Word* versión 2.0? En la mayoría de los casos el uso de aparatos se reduce a funciones básicas: reproducir una videocasete (para ver una película) o utilizar la computadora para imprimir un papel (que además corregimos a mano).

En algunas ocasiones la falta de interés por *aprender* nuevas cosas puede deberse que simplemente que no son necesarias; en otras se debe a la falta de voluntad e interés, aún cuando de alguna forma *tendríamos* que esforzarnos para hacerlo. Esta situación se expresa en gran variedad de estrategias que se desarrollan para *evitar el tener que aprender*, y en otras ocasiones *adaptamos* lo nuevo para seguir haciendo *lo viejo*.

Estas *actitudes sobre el aprendizaje* las encontramos tanto en lo cotidiano como en la escuela; funcionan tanto para aprender ciencia, como para grabar en video nuestro programa favorito.

¿Disculpa, podrías ayudarme? ... ¡gracias niño! ... ¡soy demasiado viejo para aprender!

La relación con los otros puede llegar a constituirse en y por redes sociales de apoyo, las cuales permiten hacer cosas que de forma individual no podrían hacerse: trabajo en equipo, colaboración, organización, solidaridad y demás cosas importantes que nos preparan para la vida y el trabajo. Sin embargo, las redes de apoyo pueden, a veces, servirnos para evadir aprendizajes necesarios y nos convertimos en demandantes perpetuos de favores o servicios.

En muchos hogares mexicanos en los cuales existe una computadora porque el *niño* la necesita para su escuela, los padres preguntan cantidad de cosas y terminan solicitando, rogando, ordenando o induciendo a que los *niños* hagan lo que ellos, en algún momento, pretendían hacer, por ejemplo, mandar un *e-mail*, o elaborar un documento, etcétera.

En otros espacios, como el de la escuela o la universidad, ocurren cosas similares: se generan dependencias y, a la vez, estrategias para no aprender. Así, existe el *chico que imprime los documentos, o que sabe cómo guardar un documento, o el que sabe hacer las presentaciones*. Algunas de estos conocimientos *tendrían* que ser parte de los conocimientos y habilidades de los docentes.

En lo que respecta a la educación, son diversas las reacciones del docente sobre aprender a utilizar las tecnologías y aplicarlas para la enseñanza y el aprendizaje. Esto se manifiesta desde la posición de *reacción en contra* hasta la de *reacción a favor*. Cualquiera de las “reacciones” son en parte producto de la “sorpresa” llegada de las computadoras a la vida escolar y académica, aunado a la velocidad con la que cambian los sistemas y aparatos. Pareciera que dejan sólo la posibilidad de *reaccionar en consecuencia o en defensa*.

Es necesario “sacudirse” la sorpresa y aceptar que la computadora y la Internet (y más tecnologías y servicios que son confundidos o considerados parte de estos dos) y comenzar a entender las consecuencias y las implicaciones de las nuevas tecnologías en la cultura de los estudiantes y los docentes.

Una forma de resistencia consiste en atribuir la capacidad de *conocer y aprender acerca de las tecnologías* a una cuestión *generacional*. Es decir, que de acuerdo al momento en que nacemos, en relación a la *edad* que tenemos, se determina la posibilidad y/o capacidad de conocer sobre tecnologías. Por muy absurdo que parezca esta afirmación, es la que sustenta de fondo las reacciones *en contra* e incluso *a favor* de ellas. Lo importante es adoptar una *posición activa y participativa*, que podría implicar un proceso de aprendizaje sobre las tecnologías; solamente en este proceso será posible desarrollar una actitud propositiva.

¿Sabes conducir un auto?

Conocer sobre cómo operar una computadora es algo que trae consigo oportunidades como condenas. Socialmente es un conocimiento altamente solicitado y valorado, pero no todos ambicionan poseerlo. En pocas palabras: “ya que tu sabes, ¿por qué no lo haces?”.

Sin lugar a dudas los especialistas, técnicos y expertos son necesarios para todas las áreas profesionales, del conocimiento, la tecnología y la técnica. El conocimiento se ha hecho tan complejo, que no es posible saber y solucionar todo. Sin embargo, el contexto nos exige un aprendizaje constante y el dominio de áreas que ahora *son parte de las competencias profesionales* y no accesorios.

Algún día utilizar una computadora será igual que conducir un auto o saber utilizar el teléfono, o leer y escribir.

Un automóvil es un artefacto de alto desarrollo tecnológico, al igual que la computadora. Conducir un auto es una actividad que requiere alto grado de responsabilidad y adiestramiento porque puede poner en riesgo vidas humanas, mientras que la computadora, en lo que se refiere en términos comunes y corrientes, no pone en riesgo la vida de nadie. Sin embargo, *conducir* un automóvil se ha convertido en un *conocimiento y destreza* de lo más generalizado y es parte de la *cultura urbana*, tanto así que se considera una necesidad y no siempre se requiere poseer un auto propio para saber conducir. La idea de contratar un chofer para conducir nuestro automóvil, parecería a la mayoría de nosotros algo innecesario o de un costo elevado para una actividad que podemos hacer nosotros mismos, podemos requerir al mecánico para servicios muy específicos y en circunstancias determinadas. ¿Requeriremos siempre chóferes para conducir nuestras computadoras?

El saber utilizar una computadora se está convirtiendo en parte de la *cultura general*, o en todo caso de las *competencias profesionales* de docentes e investigadores y difícilmente podremos contar con “chóferes” para cada uno de nosotros. Aunque es posible la opinión de que, no todos necesitamos un auto ni todos una computadora y, por supuesto, “el dinero no hace la felicidad”.

Entre el bien y el mal

Tomar una posición de *promoción* de la tecnología y de *defensa* en contra de ella pueden inducirnos a argumentaciones y actitudes que no permiten plantear los *cómo, quiénes y con qué fines* de la tecnología o de cualquier acción educativa que se realice. (3, 4)

La *tecnología* implica el *artefacto tecnológico* así como la *intención* del sujeto que opera el artefacto, y el objeto o realidad que se desea transformar, por ello es que, la *tecnología* es parte de las relaciones sociales y culturales, y su beneficio, uso e invención están estrechamente ligados a la sociedad que pertenecen.

Desde la perspectiva de la *tecnología educativa*, el pizarrón es una tecnología para la enseñanza y el *libro* es también, una tecnología para la enseñanza y el aprendizaje. El tiempo que llevan siendo utilizados les ha convertido en tecnologías sin cuestionar, Burbules y Calliser (3) consideran que es la *familiaridad* con ciertos objetos por lo que éstos se *vuelven relativamente invisibles* por lo que “simplemente pasaron a formar parte del mundo corriente” (p.14)

La computadora e Internet no son *invisibles*, no son como el automóvil o el pizarrón que forman parte de las actividades cotidianas¹; son tecnologías *nuevas y extrañas* que antes de ser rechazadas tendrían que ser evaluadas. Sin embargo, no podemos detener su introducción, y, tal vez si nos ponemos un poco necios, podemos evitar su paso en los centros de estudio. Pero la situación está dada, deberemos evaluar y aprender sobre la marcha y haciendo uso de ellas.

Inevitablemente las comparaciones

Sin duda el referente de *lo que ya conocemos* es necesario para *conocer lo nuevo*, sin embargo, esta comparación no debe convertirse en el rígido parámetro. Incluso las tecnologías con mucho más tiempo en la historia y que se suponen estables y de las cuales podría pensarse que ya no están sujetas a transformaciones “importantes” han presentado cambios significativos, tal es el caso de la *impresión y el libro*. El desarrollo de nuevas técnicas y tecnologías de impresión han permitido que los autores puedan utilizar algo más que palabras y tinta negra para expresar sus ideas. Actualmente, las publicaciones impresas pueden incluir palabras, imágenes, diagramas, colores e incluso materiales distintos al papel.

¹ No todas las innovaciones tecnológicas son aceptadas de forma inmediata por la sociedad, por lo que lo *cotidiano* de ciertas tecnologías son producto de un *proceso* social y no siempre del “abaratamiento” de la tecnología. Según Early C. Joseph, en un artículo citado por Kerckhove (6), nos dice: “...los transmisores fueron inventados hace cuarenta años en los laboratorios *Bell*. Fue necesario casi un decenio para que dichos dispositivos se utilizaran en computadoras... El horno de microondas, por ejemplo, necesitó más de veinte años para introducirse con éxito”. (p.247)

Landow (5) advierte que el acto de *leer* ha cambiado con en el tiempo, y que dicha actividad podía exigir esfuerzos intelectuales muy distintos a los de ahora, debido a los criterios de puntuación y edición de textos, así como por la invención de la imprenta. Por ejemplo menciona que:

“Los lectores de la época de Platón, Virgilio o san Agustín procesaban textos sin espaciado entre palabras, ni mayúsculas ni puntuación. Si hubiese leído estas frases mil quinientos años antes, habrían tenido este aspecto:

ellosseencontrabancontextostandiferentesdelosnuestrosquelamera
sugerenciadequepudiéramoscompartirlamismaexperienciadelalecturaeng
añoslectoresdelaépocadeplatónvirgilioosanagustinoricesabantossines
oacidadoentrepalabrasnimayúsculasnipuntuaciónsihubieseleídoestasfrase
smilquinientosañosanteshabríantenidoesteaspecto.” (p. 75).

Como muestra el párrafo anterior, la experiencia de lectura es una experiencia *intelectual* situada en un contexto histórico y cultural que permite y restringe simultáneamente *procesos cognitivos*.

La *publicación electrónica*, los *libros electrónicos*, o novelas hipertextuales² deben situarse también en un contexto histórico social y no sólo en una comparación con el *texto escrito* como si éste, fuera la única posibilidad de comunicar, construir y representar conocimientos.

Los *medios* que soportan y preservan la *información* se han diversificado, además del *papel* se encuentran los medios electrónicos-digitales. La *estructura* de la información depende en parte de las posibilidades que ofrece el medio o tecnología que la soporta. El *texto escrito* puede ser considerado una tecnología de preservación y construcción del *conocimiento*, el *texto escrito* puede ser soportado, almacenado y distribuido utilizando el *papel* así como el medio *electrónico-digital*. En este caso no existe ninguna diferencia entre un texto impreso y su versión electrónica.

El *libro*, cómo tecnología de preservación y almacenamiento de información requiere de ciertas *estructuras discursivas* y/o formas que adquieren la información para ser almacenada y preservada y además de que esta información pueda ser recuperable y accesible por los lectores. El uso de índices, tablas de contenido, marcas, tipografía, estructura visual, gráfica del texto, la numeración de las páginas entre otras cosas más, son parte de la tecnología del libro. Estas características varían

² La novela hipertextual no necesariamente requiere del soporte informático. Algunos ejemplos de novelas cuya estructura puede considerarse hipertextual son: *Rayuela* de Julio Cortázar (disponible en varias editoriales: Plantea, Cátedra) y *Diccionario Jázaro* de Milorad Pavic (editado por Anagrama) la cual incluso está editada en dos versiones: para “el” y para “ella”. Un ejemplo de novela en hipertexto electrónico lo tenemos con *Afternoon, a story*, de Michale Joyce editado por Eastgate Systems. Estados Unidos de Norteamérica. (Edición en CD-ROM para Macintosh y Windows).

de acuerdo a posibilidades *técnicas y tecnológicas de la impresión y procesamiento de textos*, por lo que la *forma y estructura del texto se puede ver impactada por desarrollos distintos al de la disciplina* que produce el conocimiento, el cambio de un discurso puede ser provocado no únicamente por diferentes aproximaciones metodológicas, sino por las tecnologías de *construcción y preservación* del conocimiento (7).

El *hipertexto* mantiene la relación con la *escritura*, el uso de las tecnologías alfabética, pero la estructura del discurso cambia. La *forma y estructura de lo que se escribe o construye es distinta*. La hipertextualidad es una forma de escritura no secuencial, y el acceso a la *información o conocimientos* contenidos en un *hiper-texto* son recuperados de maneras distintas con respecto al *texto impreso*.

No es lo *novedoso o lo extraño* lo que debe determinar la aceptación de una tecnología, sino sus posibilidades para facilitar y mejorar aquellos procesos y actividades en si importantes, como puede ser la enseñanza. Al respecto, es importante considerar que así como la *experiencia de la lectura* se ha transformado por el uso de nuevas convenciones en el código alfabético y por la nuevas tecnologías de impresión, el *hipertexto* ha implicado una experiencia de lectura distinta a la que proporciona la lectura de libros convencionales impresos en papel. Es de importancia considerar esta diferencia, pues implica posibilidades como restricciones en la cualidad de *transmisibilidad de conocimiento e información* (3, 5-9). Las posibilidades para *enseñar y aprender* se han diversificado, pero también lo que se *aprende* ha cambiado, no sólo en lo que respecta a los *contenidos* que, de alguna forma siempre son cambiantes, sino a la *forma en que están contenidos* o estructurados.

Comunicación y aprendizaje

La vida es un continuo aprendizaje. Comenzamos a *aprender*, incluso antes de tomar conciencia de que los hacemos. Aprendemos a *ver*, a *oír*, a *escribir*, a *comportarnos*. La sociedad que nos rodea antes y después del nacimiento nos *educa*, nos *enseña*, nos *civiliza*. Somos producto y productores de la sociedad del aprendizaje, hemos inventado la *sociedad del aprendizaje*³ (2).

Nos hemos desarrollado como *humanos*, en un constante aprendizaje cultural, se aprende a *leer y escribir*, *crear*, a *desconfiar*, a *colaborar*, a *interactuar* con otros *similares a nosotros*. En ese interactuar, intercambiamos roles constantemente de *aprendices a maestros*⁴.

³ Pozo (2) desarrolla el concepto de *sociedad del aprendizaje*. Otras expresiones similares se encuentran relacionadas pero hacen énfasis en distintas cosas. A Pozo le interesa destacar las *actividades de aprendizaje y enseñanza* que tienen lugar actualmente y cómo éstas son parte de lo que los humanos hacen todos los días. Otras términos son: "sociedad del conocimiento" y "sociedad de la información".

⁴ La expresión de *aprendiz*, es retomada de Pozo (2) y se refiere al *sujeto que aprende* y no tiene referencia al "aprendiz de oficio".

Inmersos en la dinámica socio-cultural, constantemente debemos *solucionar problemas* para continuar con nuestras vidas, es decir: *seguir resolviendo problemas*. Para lograr esto, es necesario *aprender*, de ello depende nuestra versatilidad y la posibilidad de *adaptarnos a un entorno*. Aprendemos *estrategias, técnicas* y a utilizar nuestros *conocimientos previos*. La consecuencia de este proceso es que cada vez *sabemos más*, y, en ocasiones *aprendemos, a aprender*.

Algo que hacemos todos los días, en cualquiera de nuestros papeles, sean éstos de maestros, aprendices, trabajadores, hijos, padres, hermanos o presidentes de la república (este último caso puede constituir la excepción a la regla) es *aprender*. El ambiente (social-natural-cultural) nos exige y nos permite simultáneamente aprendizajes para sobrevivir, sea la ley de la “jungla” que nos exija escalar un árbol o aventar una piedra para conservar la vida, o sea, la ley de la “civilización” que nos exige escalar una acera o aventar una piedra, también para conservar la vida.

Comunicarse con los otros, es un aprendizaje constante, milenario, necesario e ineludible. La *comunicación* se hace posible mediante el uso de *herramientas simbólicas* como el *lenguaje* (producto/productor del pensamiento) y sus posibilidades expresivas: *palabras, señas, imágenes, sonidos y olores*. La *cultura* es una matriz simbólica, acumulada históricamente y en constante transformación, que nos permite establecer *códigos negociables* para comprender y explicar la *intención* de los otros y a la vez, que *los otros* entiendan nuestras intenciones. Esta *intención de comunicar* requiere de algunos supuestos como el que tenemos *algo que decir* y que hay alguien a quien le interesa lo que decimos. Lo que *pensamos* lo estructuramos *en y por el lenguaje* y le damos forma de *mensaje inteligible*. Esto implica algunos acuerdos o *convenciones* en los códigos comunicativos (que son principalmente simbólicos) para que se de la comunicación. Palabras, colores, sonidos y señas deberán significar lo mismo para aquellos con *intención* de comunicarse. Entender y entenderse, así como explicar y explicarse son procesos conjuntos. No existen *emisores sin receptores*.

La *comunicación del conocimiento* no requiere solamente de un código común que permita estructurar un mensaje inteligible; también requiere de un *soporte* para *contener y dar a conocer* el mensaje. Para *comunicar los conocimientos*, el docente utiliza, entre otras cosas, la *oralidad*, el *pizarrón*, *gesticulación* y tecnologías como el *libro*. Las nuevas tecnologías amplían las posibilidades y también las hacen redundantes, como cuando se utilizan las tecnologías *para hacer lo mismo*.

Cosa de humanos

Comunicarse es cosa de humanos, y como tal compleja. A pesar de que es una experiencia que se da *en sociedad* y que tiene miles de años de práctica, de alguna forma aparecen los *malos entendidos o los malos explicados*.

Comunicar es un acto humano que es posible sólo porque concebimos que al que tenemos enfrente es capaz de entendernos y nosotros, a la vez, somos capaces

de hacernos entender. La forma de la *comunicación*, así como su *contenido* depende de la *relación intersubjetiva* y de los procesos, acciones y de las convenciones simbólicas para *codificar o expresar* pensamiento y/o los contenidos, es decir de las posibilidades para construir y transmitir un mensaje.

Los *mensajes* son “traseúntes” en constante riesgo: pueden ser atropellados por el escandaloso *claxon* de un camión, por una mala caligrafía o una impertinente falla en la línea telefónica y nunca llegar a su destino, pero incluso aunque el mensaje llegara en perfecto estado de “salud”, puede ser olvidado, o no ser comprendido. Como toda acción humana y sus consecuencias : ¡requerimos culpables! ¿es el emisor culpable por enviar un mensaje *olvidable o perdible*? o ¿el receptor tiene la culpa por olvidar o no comprender el mensaje?

En el aula, e incluso para la pedagogía y la psicología educativa, ya se ha encontrado al responsable de la “incomunicación”: Términos como “*problemas de aprendizaje*”, se aplican al sujeto que aprende, es decir al alumno, con este punto de partida, difícilmente se podría hablar de *problemas de enseñanza* como una *incapacidad del docente para enseñar y comunicar*, en un acto de autoridad se determina que el “problema” reside en el alumno. Si bien la didáctica y la pedagogía se han preocupado por proponer modelos que permitan el mayor éxito a la intervención educativa del docente, cuando alguna estrategia no resulta, se le adjudica el *problema al alumno*. Lo interesante, en todo caso, es no partir de un juicio, sino de una problemática a resolver. Así como la intervención pedagógica puede ser guiada por teorías y técnicas didácticas, el aprendizaje también puede ser apoyado por *técnicas y estrategias*. Una de ellas pueden ser la utilización de los mapas conceptuales, de los cuales se tratará más adelante.

Un juicio de lo anterior trae consigo atenuantes y agravantes de los actores de la comunicación, suspendiendo la búsqueda de culpables, a lo que hay que prestar atención es al hecho de que no existe un código comunicativo absoluto: la *comunicación es un proceso continuo, dinámico y vivo* que requiere de *medios* que pueden dar mayor seguridad y mejorar el *proceso comunicativo*, pero que no eliminan el factor activo y humano de la comunicación, pues sobre todo lo dota de *flexibilidad*.

El mensaje y su envase

Los *mensajes* pueden ser soportados en distintos *medios*, éstos a su vez, permiten y restringen la estructura del mensaje y el tipo de información que contienen. La finalidad del mensaje es la de *representar* de la mejor forma aquello que pensamos y satisfacer nuestra *ansiedad comunicativa*.

El *dinero* fue y es una de las *herramientas simbólicas* que sirvieron para fijar un código estable para representar acuerdos, pensamientos y relaciones que forzaba a *compartir y explicitar una idea común* que quedaba “fija” e independiente de la memoria o de caprichos de una de las partes (6).

La escritura, supone Kerckhove (6), se origina posteriormente a la *representación del valor* (dinero) y con relación a la necesidad de preservar las *ideas originales*. Desde la *comunicación*, el *alfabeto* es una tecnología para la construcción y preservación del mensaje. Una vez *escrito* sirve para salvaguardar el *contenido*, la *intención original*.

La escritura es un soporte para la memoria histórica y social; la *alfabetización* de los hombres permitió el *almacenamiento y producción de conocimientos*; la preservación del conocimiento mediante la memoria y la oralidad fue desplazada en occidente por el *texto escrito*, cuya forma o medio actual es el *libro*, convirtiéndose así este último en la *materialización del conocimiento* y después en *mercancía*.

En términos de la persona, la alfabetización requiere desarrollar determinadas habilidades cognitivas. *En y por medio* del proceso de *lectura-escritura* se provocan *formas de pensamiento* (7). La escritura como tecnología es un producto y productor de *racionalidad*, es decir de la explicación del origen y causa de las cosas. Es el *texto escrito* un modelo de representación del *pensamiento abstracto* y a la vez, el *mensaje* cuyo medio es, desde la invención de la imprenta, el *papel impreso*.

Texto, impresos y digitales

El *texto escrito e impreso* en el ámbito de la educación, es el soporte más estándar y extendido de la información y el conocimiento y la forma que toma es la del *libro*. *Apropiarse* de los *contenidos o conocimiento* del libro es la meta de la mayoría de las actividades de aprendizaje.

El *libro* es un icono del siglo XX cuya tecnología de producción ha cambiado permitiendo agregar elementos adicionales a las palabras, por ejemplo color, gráficos, fotografías y tablas entre otros. La tecnología del libro no sólo se expresa en la *impresión*, sino en otros elementos que le otorgan cualidades para el acceso de información, por ejemplo los índices generales, índices de nombres, índices temáticos, así como la misma estructura del texto que separa los tipos de información en bloques, como son los capítulos, anexos, bibliografía, etcétera.

Las cualidades mencionadas con respecto al acceso de información en el libro es importante, pues de cierta forma *permite* que la información o contenidos sean *encontrados* de forma más rápida y exacta. Desde esta perspectiva, el libro es un *tipo* de tecnología de almacenamiento y acceso a la información.

Desde la aparición de las computadoras y de las primeras versiones electrónicas de textos se ha iniciado un debate sobre las cualidades, posibilidades y restricciones de cada uno de los medios, es decir, se ha debatido si el *libro impreso* es mejor o si *libro o texto electrónico* lo es más⁵. Los argumentos de ambos lados se refieren a diversos

⁵ Un "libro" que aborda el debate es: Numberg, (compilador): *El futuro del libro. ¿Esto matará eso* (10).

temas: la transportabilidad del texto, la comodidad de la lectura, la estructura del discurso, la interactividad, la posibilidad de su distribución, entre otros temas. Algunas discusiones de un lado como del otro, han perdido su razón u oportunidad ya sea por que los “vaticinios” del *fin y del inicio* no se han cumplido tan claramente y totalmente como se suponía, o bien porque el desarrollo de las distintas tecnologías, tanto aquellas electrónicas como analógicas, han generado nuevas posibilidades y experiencias antes no contempladas.

Cada uno de nosotros puede tener su opinión y ser parte de los “electrónicos/digitales” o los “analógicos”. Lo que se ha demostrado actualmente es que cada uno de los *soportes de información* funcionan de mejor forma en determinadas circunstancias. Por ejemplo, las enciclopedias electrónicas o manuales de referencias cuyas versiones *digitales o electrónicas* y soportadas en CD-ROM son más *cómodas y rápidas* de utilizar que las versiones impresas. En el caso de manuales y catálogos, las versiones electrónicas son más fácilmente actualizables que una versión impresa. Un caso distinto son por ejemplo, una *novela* o el periódico cuyas versiones impresas, sea por tradición o por funcionalidad, no requieren o no se benefician tanto de adoptar un formato digital.

Lo relevante es identificar que el acceso y soporte de la información ha cambiado y que, si bien el libro es hoy todavía un soporte aceptado y de prestigio, las versiones electrónicas irán ganando terreno y será necesario desarrollar también estrategias para poder aprovecharlas.

No leí la novela pero vi la película

Para Giovanni Sartori (11) de *Homo sapiens* se ha pasado a *Homo videns*, es decir que la *era de la palabra escrita* ha sido sucedida por la *era de la imagen*. Para Sartori, este abandono de lo *escrito por lo visual*, el paso de *leer-pensar a sólo ver*, significa un *empobrecimiento de las capacidades cognitivas del hombre* y mucho de esto se debe a la práctica constante y extendida de *ver* televisión.

El problema, según lo ve Sartori (11), es la incapacidad del *Homo videns* por comprender el *lenguaje abstracto* y por tanto la dificultad de acceder y comprender el conocimiento científico, el cual está construido y almacenado precisamente mediante el lenguaje abstracto. En vez de esto, el *Homo videns* se encuentra altamente especializado para el consumo de la *imagen*, que requiere de un *lenguaje concreto* cuyas características mediáticas contemplativas (televisión) impiden la construcción de símbolos y abstracciones por tanto el abandono del pensamiento abstracto y científico. En palabras de Sartori (11): “... el *homo sapiens* ha entrado en crisis, una crisis de pérdida de conocimiento y de capacidad de saber”. (p. 61)

Punto de vista distinto, el de Raffaele Simone (7). El considera que es necesario aceptar que existen *otras formas de conocer y de conocimiento*. La diferencia de fondo entre los planteamientos de Simone y Sartori está en lo que se considera *conocimiento*,

y en particular el conocimiento científico o complejo. Para Sartori el *conocimiento* tiene una forma primordial: es *escrito* y es un *texto* objetivado en *libro*. Para Simone, el conocimiento puede tener distintas estructuras a la de un texto y otras formas distintas al libro, esto le permite analizar otras posibilidades del pensamiento y la construcción de nuevos y valiosos conocimientos. Simone considera que entramos en una *tercera fase* cuya característica es la variedad o diversidad de la formas del conocimiento, el libro ha dejado de ser el emblema del conocimiento y la cultura (7), y más allá del soporte de éste, está *la forma de conocer*, es decir, (y en términos generales), el cambio en las formas de conocer no es leer *un* mismo libro en su versión electrónica, sino de un *objeto que contiene conocimiento* cuya estructura y contenidos es distinto, digamos un multimedia o un video. Las “otras” formas de conocer distintas a la lectura de textos, se van convirtiendo en dominantes, talvez en algunas áreas del conocimiento este fenómeno sea menos frecuente, pero en términos generales, las *necesidades de conocimiento* comienzan a resolverse (insistimos, en algunos casos) fuera de los libros impresos, a este contexto Simone le llama *la tercera fase*, vale la pena, -como dice el autor-, evaluar si, en estos cambios de *formas de conocer* las *ganancias son más grandes que las pérdidas*

Las posturas de Sartori y Simone permiten reconocer que existe una forma distinta de pensar y conocer, en el caso de Sartorio el panorama no es esperanzador puesto que supone que la pérdida de la capacidad del hombre para el uso y comprensión del *lenguaje abstracto* no le permitirá el desarrollo y progreso de las ideas y de la ciencia, lo cual es parcialmente cierto, es decir, si el conocimiento que se pretende construir requiere de procesos abstractos del pensamiento, su codificación, estructuración e invención mediante el uso del alfabeto y su organización y comunicación mediante el texto, requiere entonces de habilidades del pensamiento abstracto; en ese sentido sin duda que la pérdida de las capacidades para manejar el código alfabético y el pensamiento abstracto impediría el desarrollo de un tipo de conocimiento. Sin embargo, como lo advierte Simone, es posible pensar que existe un conocimiento que puede ser construido con elementos distintos al alfabético y para ello se requieran habilidades distintas o no únicamente del manejo del *lenguaje abstracto*, como por ejemplo, la interpretación de imágenes y gráficos como actividades directamente relacionadas a la construcción y comunicación del conocimiento. Tufte (12) contribuye con un argumento interesante de cómo la representación gráfica de los datos puede abrir caminos al razonamiento para la solución de problemas, que de otra forma difícilmente podrían darse⁶.

Una perspectiva propositiva con respecto al uso de *las palabras e imágenes* y la capacidad de éstas de *comunicar* información y conocimiento es la de Robert Horn (13). Para Horn, el *lenguaje visual integra palabras, imágenes y formas* en una sola “unidad comunicativa” (p.8) y argumenta que el uso integrado de tales elementos son parte de la cultura y la comunicación, por lo cual es importante conocer cuál sería la

⁶ De manera especial Edward R. Tufte (12) menciona al menos dos casos, el que se refiere a una epidemia de cólera en Londres en 1854, y el de que se podía haber evitado el lanzamiento del trasbordador espacial *Challenger* en 1986 basándose en información que “evidenciaba” el riesgo de la explosión.

mejor forma de estructurar un mensaje para que éste explique o represente de la mejor forma las ideas, los conocimientos y la información.

El panorama que abren los diversos planteamientos, según lo vemos, es un espacio de *posibilidades*, ya que no existe una forma de ser o de pensar única y *completamente determinada* y que ambas posibilidades comparten la realidad del hombre. Por una parte, es cierto que la *escritura* permitió el desarrollo del pensamiento y la ciencia y que transformó al *hombre* como especie, sin embargo, no puede considerarse que todos los seres humanos de este planeta *perdieron su "alfabetibidad"* por la exposición frente a la televisión, así como tampoco todos los hombres se encuentran tecnológicamente alfabetizados y construyen conocimientos con herramientas hipertextuales y multimediales.

El campo de batalla

Las nuevas tecnologías de la información y comunicación, en especial la Internet y los multimedia, son parte actual de la problemática educativa. Sea a favor o en contra, existe un debate que pretende convencer o demostrar a unos y otros sobre los beneficios, peligros o posibilidades del uso de dichas tecnologías.

Desde una perspectiva de la *tecnología educativa*, que implica ir más allá de la instrumentación didáctica de los medios⁷, las *redes* y las aplicaciones informáticas abren posibilidades para la *creación y utilización de software educativo* sin que esto implique al docente y/o al alumnos convertirse en expertos programadores. Más bien, es asumir que el uso creativo de la tecnología, materiales existentes y materiales de autoría propia requieren de iniciar un proceso gradual de *apropiación de la tecnología*, de un aprendizaje continuo que demanda tiempo y esfuerzo, pero sobre todo que es *necesario y útil*.

De acuerdo a Jonassen (14) el aprendizaje que ha implicado a las computadoras puede distinguirse y organizarse de la siguiente forma:

- Aprendizaje *asistido* por computadoras. Se refiere a que los objetivos del aprendizaje son logrados por la *intervención* de un *software/computadora* estableciendo el orden y tipo de actividades de aprendizaje.
- Aprendizaje *acerca de* computadoras. Lo que se aprende es sobre la *computadora en sí*, partes, componentes, posibles usos y sobre *cómo hacer*, por

⁷ Existe un debate en torno a la que debe entenderse por tecnología educativa. En algunas consideraciones se le da a la *tecnología educativa* una intervención de *uso de los medios*, es decir, el *uso de aparatos para una mejor enseñanza*. Otras perspectivas consideran la *tecnología educativa* como una disciplina que planea, organiza y sistematiza la intervención educativa en un entorno o mediación tecnológica y el debate continua. Al respecto puede consultarse: Julio Cabero (15) "Tecnología Educativa: diversas formas de definirla" en Cabero, J. (ed.), *Tecnología educativa* (pp. 17-50). Madrid: Síntesis Educación. Para una perspectiva mucho más completa e histórica puede consultarse del mismo autor: Cabero (16).

ejemplo: *cómo imprimir, cómo guardar un archivo, cómo proyectar una presentación, etcétera.*

- Aprendizaje *con* computadoras. Esta perspectiva supone a la *computadora y software* como herramientas que son utilizadas de diversas formas por los aprendices, sirviéndoles como *recurso o referencia de información, medio de comunicación, herramientas para hacer algo*, en general como *herramientas mentales o de aprendizaje*.⁸

Los dos primeros tipos de aprendizaje son los más comunes en lo que respecta a actividades de aprendizaje escolares. La tercera perspectiva involucra mayor complejidad y depende de muy variadas posiciones disciplinarias y teóricas. Los tres tipos de aprendizajes no son excluyentes entre sí, ni tampoco consecutivos. La importancia de destacarlos es *identificar* que diversas *actividades de aprendizaje* pueden requerir o utilizar *computadoras* y aún así tener *objetivos* distintos.

Para el docente cada uno de los distintos aspectos del aprendizaje mencionados le *posibilitan* el *usar y beneficiarse* de las computadoras, sin embargo esto no basta para proporcionar estrategias claras en el uso de la máquinas para *facilitar o propiciar aprendizajes en los alumnos*. El que el docente aprenda a utilizar una hoja de cálculo para obtener promedios y calificaciones y no se relaciona directamente con las *actividades de enseñanza* ni con las *actividades de aprendizaje*.

Cada individuo carga con una historia personal de aprendizajes: algunos de los aprendizajes son únicos pues se dan en contextos particulares y en situaciones y momentos que son significativos para cada individuo, y es cierto, solamente *aprende* el individuo, nadie puede aprender por alguien más (2).

De acuerdo con lo anterior, podría suponerse que el docente no tiene nada que hacer, después de todo, no podemos *hacer que alguien aprenda*. Sin embargo, existen muchas posibilidades de *facilitar, propiciar y conducir los aprendizajes*. No es posible *ordenarle a alguien que aprenda*, no todos los aprendizajes dependen de la *repetición, la memoria o la necesidad*, en ocasiones los aprendizajes *dependen* de “tips”, “trucos” y “espacios”, llamados de forma más correcta *técnicas de estudio, estrategias de aprendizaje y entornos de aprendizaje*.

Comprender como se da el aprendizaje permite, desde la perspectiva docente, diseñar *estrategias de enseñanza, enseñar técnicas de estudio, diseñar entornos de aprendizaje, provocar y animar la reflexión sobre el propio aprendizaje*.

Las tareas anteriores implican una actividad docente constante y se encuentra muy lejos de la contemplación de lo que hacen los estudiantes a la vez que no

⁸ Jonassen (14) propone el concepto de *Mindtools* el cual es desarrollado en el transcurso de su libro *Computers as mindtools for schools*. El término *mindtools* podría traducirse como *herramientas mentales*. Otras aproximaciones similares pero con referentes teóricos distintos puede ser: *herramientas psicológicas, tecnologías de aprendizaje, mediadores del aprendizaje* (17).

excluyen la actividad de *enseñar*, pero es necesario ponderar los efectos de la enseñanza, es decir *enseñar no produce o causa aprendizaje*, la enseñanza es fundamental pues ofrece al alumno los espacios, tiempos y recursos de información que le pueden *guiar o propiciar sus aprendizajes*. La intervención docente no se agota en la exposición del tema. La observación, disposición e interés por el aprendizaje de los alumnos lo llevará a idear tareas y actividades que *complementarán o darán sentido* a la exposición o lecturas de textos, esto implica una constante evaluación de los logros y retos de aprendizaje de sus alumnos.

Conciliaciones entre lenguaje abstracto y lenguaje concreto

Los alumnos que llegan hoy frente al docente están dotados de *experiencias*, algunas completamente ajenas al *docente*. No todas las experiencias son relevantes para un determinado tipo de aprendizaje, otras simplemente no intervienen y algunas más pueden inhibir o dificultar los aprendizajes o las actividades requeridas para propiciar dichos aprendizajes, sin embargo, todas ellas son parte de la persona que aprende y de la que enseña.

El *saber* para utilizar una computadora, operar un procesador de textos, estrategias de búsqueda de información en bases de datos e Internet, el conocimiento de herramientas de comunicación e intercambio de información como el *e-mail*, el *chat*, grupos de discusión y otros, pueden ser *irrelevantes* si el docente decide que nada de eso sirve y se inhibe su utilización en clase y en las actividades y tareas que se desarrollen.

Ciertos *requisitos* para el aprendizaje se encuentran tan establecidos en la sociedad que no se discuten *si deberían ser; simplemente son*. Por ejemplo, sería inconcebible que una persona que no sabe leer ni escribir, cursara un carrera universitaria, o que alguien incapaz de comunicarse, participara en *grupos de aprendizaje*. No todos los *requisitos* para el aprendizaje son tan definidos. Podríamos preguntar: ¿es indispensable (requisito) para la educación media superior y superior que el alumno sepa usar la Internet y los procesadores de texto? Pero ¿y para el docente?

Las respuestas a las anteriores preguntas serán diversas y muchas de ellas buscarán *ponderar* cuándo sí, y cuándo no, es necesario poseer determinadas *habilidades y/o conocimientos*. ¿Y qué pasa cuando los *alumnos ya las tienen*? De ser así *podrían ser potencialidades que les permitan aprender*. También es necesario considerar distractores o *inconvenientes* como pueden ser los juegos o la información dudosa, y que se imprime y se presenta como trabajo elaborado por el alumno y demás tretas que puedan ser imaginadas. Lo que tiene que aclararse es: que las habilidades y conocimientos sobre Internet y las computadoras *no provocan* esas conductas: lo mismo puede hacer con lápiz y papel, o con un juego de cartas de papel reciclado.

SEGUNDA PARTE: Guía para la elaboración de Mapas Conceptuales y sus aplicaciones en la enseñanza y el aprendizaje.

Segunda Introducción

Este apartado se propone exponer las posibilidades del uso de mapas conceptuales como *esquemas de representación del conocimiento*. Dadas sus características, - que serán discutidas en el transcurso de documento- se presentan como recursos de síntesis y organización de conocimientos y contenidos.

El recurso del mapa conceptual ha sido utilizado de maneras muy diversas. Aparte de su uso como sistema de representación de conocimiento e información, se ha comenzado a utilizar como interfase de navegación en sistemas hipertextuales. Se han aplicado como metodología de trabajo con grupos, herramienta de evaluación de los aprendizajes, organización de exposiciones, planeación de programas y cursos, técnica de estudio, técnica de lectura, entre otras más.

Con las posibilidades que ahora ofrecen las herramientas informáticas y las tecnologías y sistemas de comunicación e información, se diversifican las posibilidades del uso de los mapas conceptuales, pero antes de imaginar nuevas posibilidades, se hace necesario aprender la técnica básica para la elaboración y diseño de los mapas conceptuales. Por ello este apartado pretende ser una *guía para elaborar mapas conceptuales* y se sugieren algunas posibilidades de combinar los mapas conceptuales y el uso y aplicación de tecnologías de la información y comunicación.

La importancia de los mapas conceptuales en el contexto de la nuevas tecnologías no radica solamente en su uso y aplicación a sistemas de información y diseño de interfases (que implica un uso más especializado o enfocado al desarrollo de material educativo). Los mapas también pueden servir ahora como “mapas de navegación” en medio de la mar de información, nos permite recobrar el “sentido” y la “dirección” que a veces se pierden en las tormentas de información no siempre del todo relevantes.

Es necesario aclarar que, las características de diseño y el proceso de elaboración de mapas conceptuales se encuentran fundamentadas en teorías psicológicas que es importante reconocer, al menos en su parte más relacionada con el mapa conceptual, para comprender la importancia y posibilidades para el aprendizaje de quien lo realiza y de sus posibilidades como representación para quien lo lee.

Se presentan en este apartado aproximaciones al tema de debate y a la diversidad en las aplicaciones, con la idea de orientar los intereses del lector/docente y será éste -el lector/docente- quien decida ir “más allá” de esta visión general del tema.

Se deja de lado en este documento, por una cuestión temática y de espacio, las técnicas de evaluación de los aprendizajes mediante mapas conceptuales⁹.

Se considera además que los **mapas conceptuales** pueden ser utilizados como una forma de *conciliar* el **lenguaje abstracto y el lenguaje visual**. La combinación de ambos elementos obliga a lectores y constructores de mapas conceptuales a “entrar y salir” de las lógicas visuales y las conceptuales. En este sentido, el mapa conceptual es una *representación visual-conceptual*, que puede ser el inicio de la amistad y mutua comprensión de *Homo videns* y *Homo sapiens*.

Lo que puede entenderse por Mapa Conceptual

No existe una definición única de mapa conceptual. Esto se debe a que existe una gran variedad de usos y aplicaciones de ellos. Actualmente la técnica de los *mapas conceptuales* es utilizada por investigadores, empresas, docentes, profesionales y técnicos. Las aplicaciones varían desde estrategias para mejorar los procesos de comunicación en empresas (18), hasta su uso para el análisis de información de las sondas espaciales (<http://www.coginst.uwf.edu/projects/mars2000/mars2000.html>).

Esta diversidad y extensión del uso de los mapas conceptuales ha traído a su vez, una gran diversidad en la metodología de elaboración y sus aplicaciones en áreas distintas a la de la enseñanza.

Los mapas conceptuales surgen como una propuesta de un grupo de investigadores coordinados y representados por Joseph D. Novak y D. Bob Gowin, quienes en 1984 publican un libro en el cual se explica el uso, elaboración y aplicaciones de los mapas conceptuales y los diagramas “V”. Dicho libro fue traducido y publicado en 1988 como *Aprendiendo a aprender*, editado por Martínez Roca (19).

En *Aprendiendo a aprender* encontramos los fundamentos teóricos sobre los mapas conceptuales, diversos ejemplos y consejos para su implementación y elaboración. Es sin duda una obra fundamental para conocer los orígenes de la propuesta.

La aproximación de mayor interés, en este caso, es el considerar el mapa conceptual como **un esquema de representación de conocimiento** y como un *mapa de acceso organizado y estructurado a la información* (que de utilizarse en un sistema de informáticos podría ser empleado como *interfase de navegación* en ambientes hipertextuales), que en una aplicación práctica podría servir como *guía de lectura* para textos.

⁹ Novak y Gowin (19) proponen una técnica de evaluación de los mapas conceptuales; otros autores han propuesto nuevas formas de “calificación” de mapas conceptuales y de evaluación de los aprendizajes utilizando los mapas conceptuales. Se pueden mencionar a: Ontoria y otros (20). Edmondson (21), Trowbridge y Wandersee (22).

A continuación se presenta un mapa conceptual elaborado por Novak (pág. 54 de la ref. 19) que presenta los elementos básicos a considerar para la elaboración de un mapa conceptual. Más adelante se explicará de forma detallada los aspectos de su lectura¹⁰.

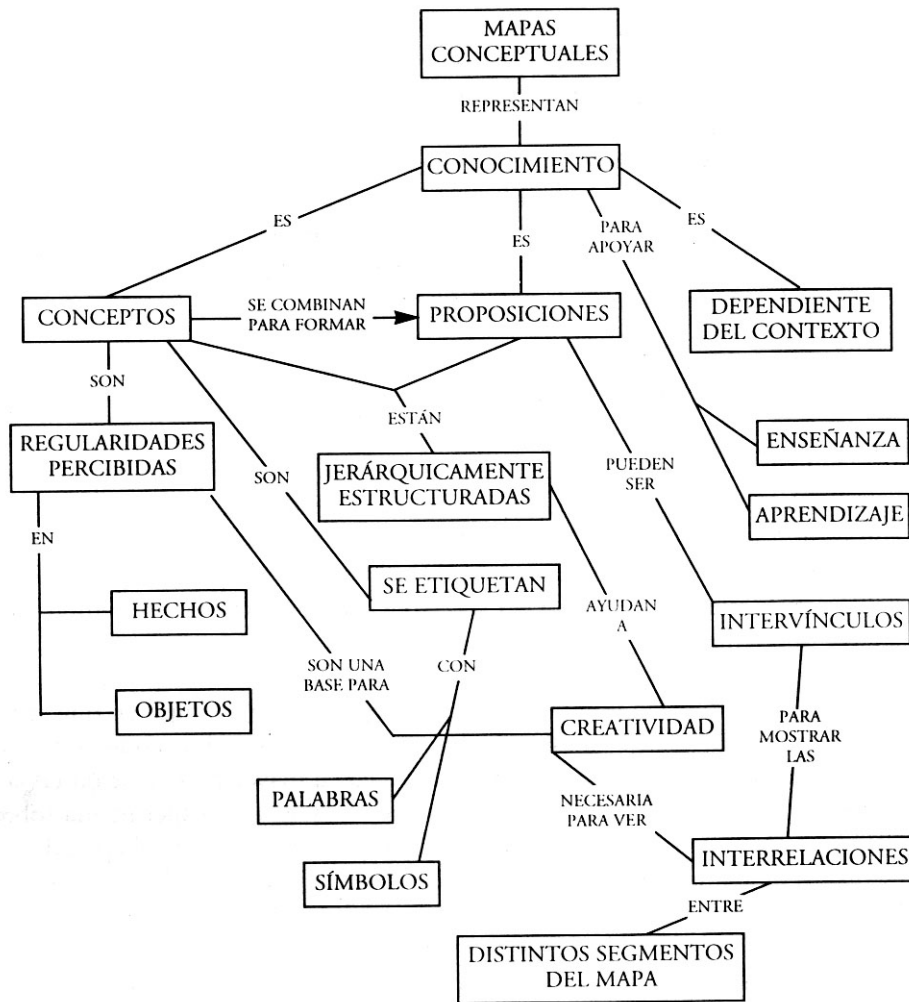


Figura 1. Mapa conceptual tomado de Novak (18). “Mapa conceptual que muestra las ideas y principios que debe poseer un buen mapa conceptual”. (Pág. 54).

¹⁰ Posteriormente se abordará el tema de cómo se leen los mapas conceptuales. La idea de introducir en este momento un mapa conceptual es el de familiarizar al lector con este tipo de esquemas. Puede decirse que la lectura se hace de arriba hacia abajo, leyendo los conceptos, se sigue la línea o líneas que salen del concepto y se lee la *palabra enlace* y después el concepto al que “llega” la línea o conector.

El mapa conceptual y sus posibilidades como esquema

Para quien observa un mapa conceptual, sin saber los procesos de su elaboración, lo que ve es un *esquema* y no un *mapa conceptual*. No es equivocado considerar el mapa conceptual como esquema, sin embargo es importante reconocer características particulares que lo distinguen de otro tipo de representaciones, pues la distinción va más allá del aspecto gráfico.

El mapa conceptual es un tipo particular de esquema que representa y *muestra relaciones conceptuales*. Considerado así, es un recurso esquemático que *permite sintetizar y a la vez, mostrar los elementos* más significativos de la información a partir de la cual fue elaborado.

Es posible elaborar mapas conceptuales de textos, entrevistas, procedimientos, proyectos de investigación, películas, eventos o cualquier tipo de fuente cuya interpretación exija el empleo de conceptos y su relaciones. Un ejemplo de mapa conceptual es el siguiente:

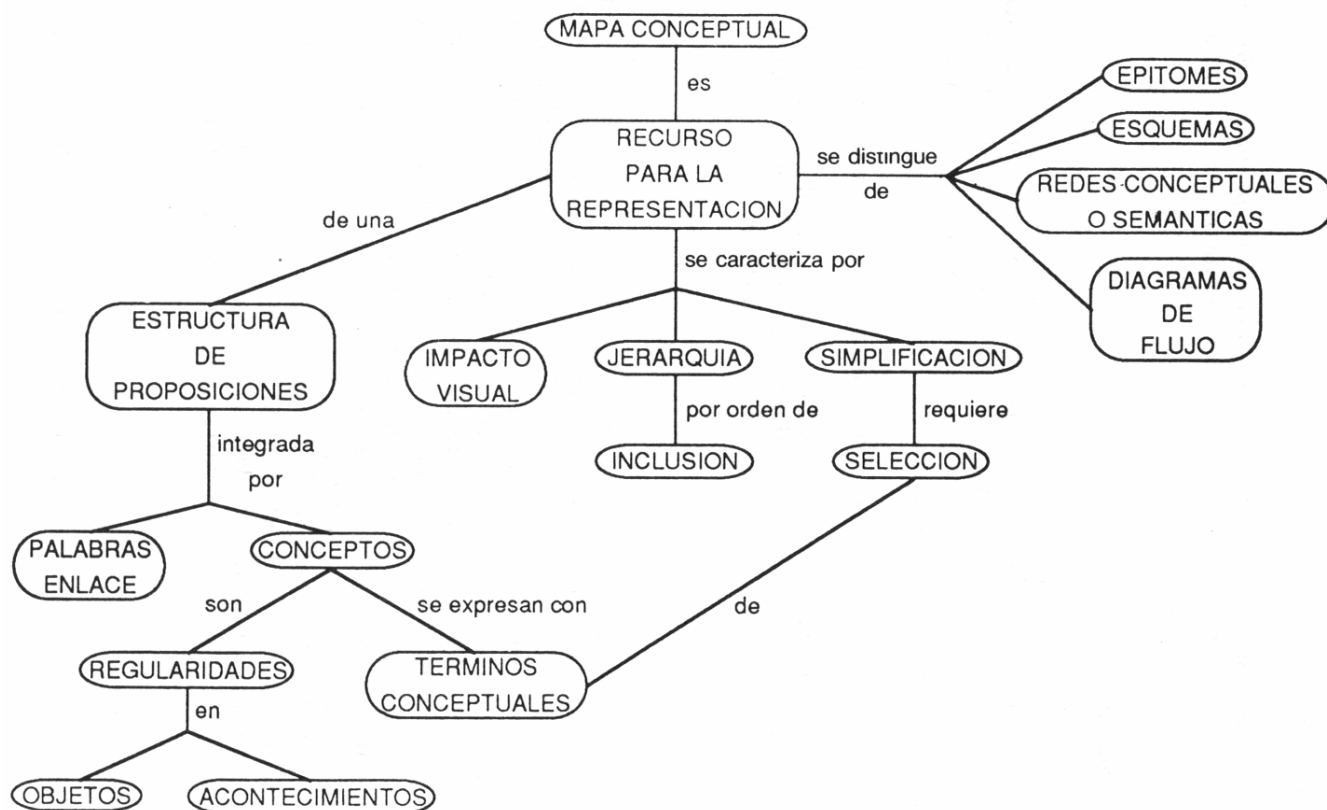


Figura 2. Mapa Conceptual sobre el "Mapa Conceptual" como recurso para la representación. (Tomado de: Ontoria, et al. (20) Pág. 38).

El mapa conceptual visualizado como un esquema contiene características importantes a considerar. Siguiendo a Ontoria (20) las *calidades de mapa conceptual son: su impacto visual y la posibilidad de simplificar y mostrar las relaciones conceptuales*.

Adicionalmente, puede considerarse valiosa la posibilidad de mostrar simultáneamente los conceptos más significativos, sus relaciones y la cualidad de esas relaciones. Esto significa que va más allá de la identificación de conceptos claves, pudiendo representarse las estructuras proposicionales significativas que distinguen al discurso del cual se extrae, es decir, de un texto, charla, película, etcétera.

En el caso de ser una representación de conocimiento, el mapa conceptual es valioso pues permite presentar una síntesis de los contenidos y simultáneamente resaltar los conceptos más significativos que pueden propiciar claves valiosas para el aprendizaje de textos, orientar la búsqueda de información y marcar las relaciones más significativas entre los conceptos, así como su jerarquización.

Elementos que componen el mapa conceptual

Bajo la idea de *esquema de representación*, el mapa conceptual es una forma de representar visualmente estructuras proposicionales, identificando simultáneamente los conceptos más significativos y su jerarquía (qué tan generales o particulares son).

Es importante destacar que el fundamento teórico que Novak (18, 19) da a los mapas conceptuales se apoya en la teoría del aprendizaje de Ausubel y pretende explicar, a la vez que aplicar, la propuesta de *aprendizaje significativo*. Si bien el uso de los mapas se ha extendido sin que necesariamente se consideren sus bases teóricas de forma profunda, es importante conocerlas para quien desee entender las implicaciones en el proceso de elaboración de los mapas conceptuales.

Novak y Gowin (19) dicen que: “Los mapas conceptuales tiene por objeto representar relaciones significativas entre conceptos en forma de proposiciones” (pág. 33), de tal modo que la forma más simple y reducida de un mapa conceptual sería la constituida por dos conceptos, una liga y una palabra enlace.

Utilizando el ejemplo de Novak y Gowin, a partir de la proposición:

“El cielo es azul”

Se pueden reconocer los siguientes conceptos::

cielo
azul

Las palabras “El” y “es” no son conceptos. En este caso la palabra “es” representa el conectivo que permite unir los dos conceptos.

La representación gráfica de estos conceptos sería la ilustrada en la figura 3:

Los componentes básicos del mapa conceptual como esquema son:

1. Los **conceptos**. El círculo que los encierra tiene la función de resaltar la palabra he indicar o hacer explícito que se trata de un concepto. Su utilidad es con respecto al impacto visual y la facilidad de lectura del mapa.

2. Las **ligas**. Son las líneas que unen los conceptos; éstas permiten marcar las relaciones entre los conceptos. En algunos casos, es posible o incluso necesario terminar las líneas con una flecha. Esto último para indicar la dirección de lectura del conectivo o palabra de enlace.

3. La **palabra de enlace** permite unir dos conceptos y dan la "cualidad" de dicha relación, es decir, que marcan cuál es la relación entre los conceptos.

En la figura 4 se pueden observar los componentes básicos del mapa conceptual considerado como recurso de esquema.

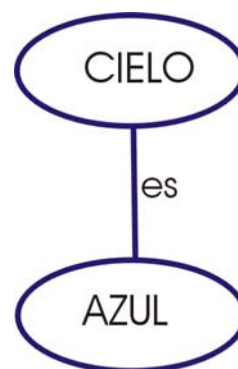


Figura 3. La forma más simple del mapa conceptual.

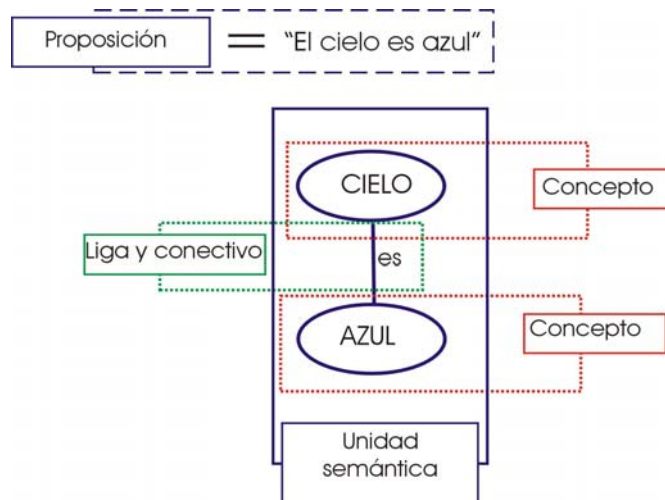


Figura 4. Se presentan los componentes básicos del diseño del mapa conceptual.

En un principio Novak, Gowin y colaboradores proponían el mapa conceptual sin las palabras enlace. Esto permitía marcar cierta jerarquía conceptual y relaciones entre los conceptos, sin embargo, se mostró que sin las palabras enlace las relaciones entre conceptos resultaban, en algunos casos confusas, pues no todo aquel que leía el mapa conceptual "ponía" los enlaces debidos. En la figura 5 se presenta un ejemplo que el mismo Novak (18) proporciona para ilustrar la importancia de las palabras de enlace.

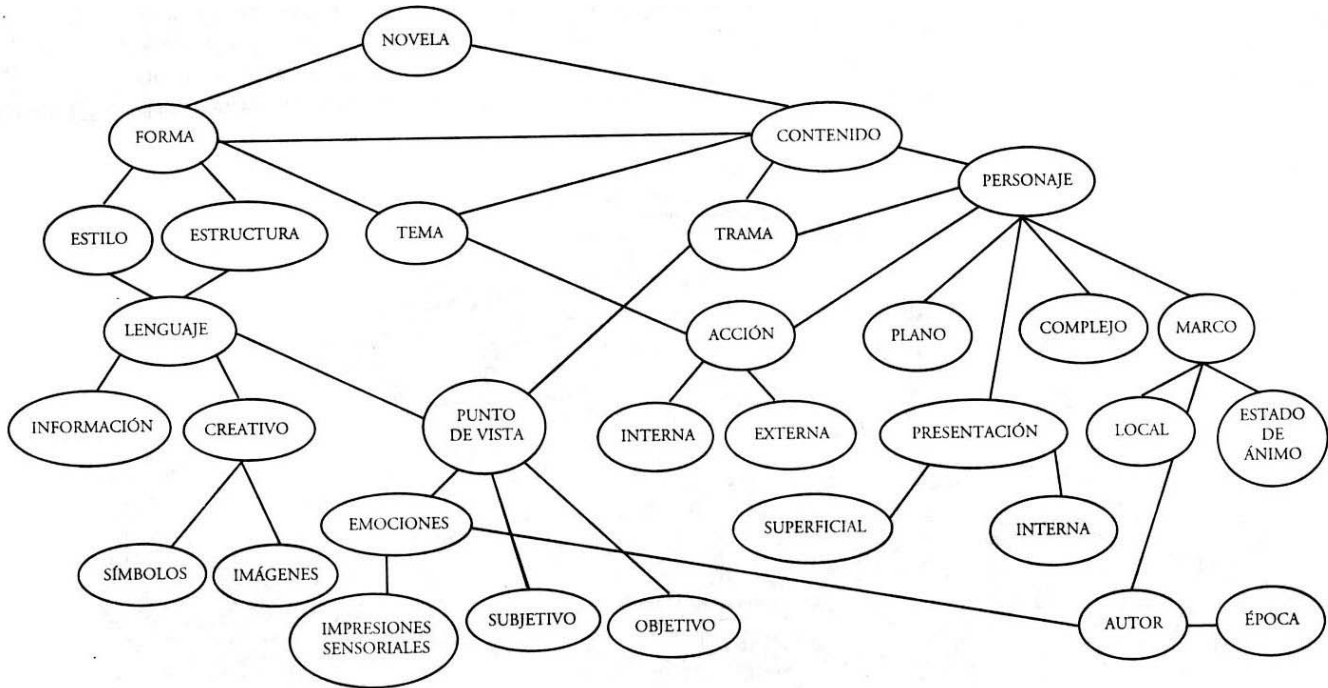


Figura 5. Prototipo de mapa conceptual. Tomado de Novak (18). Este mapa representa la estructura de análisis de la novela. Lo que se muestra es la ausencia de palabras enlace, lo cual hace más variable la interpretación y/o lectura del mapa conceptual.

Usos y Aplicaciones de los mapas conceptuales

Las aplicaciones y usos de los mapas conceptuales son muy variadas, y de acuerdo a los diversos autores que han reflexionado sobre el tema, el uso y aplicación depende, tanto de los referentes teóricos sobre educación y aprendizaje, como de las propias experiencias en la utilización de los mapas conceptuales.

En la Tabla 1, se presenta una generalización sobre los usos y aplicaciones de los mapas. Para su elaboración se consultaron los textos a los cuales se hace referencia. En algunos de ellos se hace referencia explícita al “uso y aplicación” de los mapas conceptuales, en otros casos en los que no se hace mención explícita sobre el uso y aplicación, hemos decidido agruparlas con aquellas que mejor las representen.

Una aplicación más es la que propone Novak (18), en la que los mapas conceptuales son parte de una estrategia para negociar y comprender puntos de vista en empresas, con la finalidad de mejorar sus procesos de comunicación. No se incluye en el cuadro ya que no existen más referencias similares.

Tabla 1. Posibles usos y aplicaciones de los mapas conceptuales y algunos de los autores que proponen dichas posibilidades.

| Uso, aplicación o posibilidad de los mapas conceptuales | Autores. |
|--|--|
| Planeación y desarrollo de sistemas de información. | Kommers y Lanzing (23) |
| Interfase de acceso organizado a la información en sistemas informáticos | Kommers y Lanzing (23) Cañas y otros (24). |
| Representación visual-conceptual de las estructuras proposicionales de los sujetos que los elaboran. | Kommers y Lanzing (23) Novak [18] McAlesse [25] Trowbridge y Wandersee (22) |
| Facilitadores del aprendizaje. | Kommers y Lanzing (23) Ontoria y otros. (20 y 26) Novak (18) Novak y Gowin (19) Edmondson (21) |
| Técnica para el diseño curricular y la organización de contenidos para exposición. | Novak (18) Novak y Gowin (19) |
| Estrategia didáctica en el aula. | Novak (18) Novak y Gowin (19) |
| Estrategia para compartir significados entre maestros y alumnos y como promotores del aprendizaje significativo. | Novak (18) Ontoria y otros (20) Trowbridge y Wandersee (22) |
| Organizador y facilitador de la memoria. | Novak y Gowin (19) McAlesse (25) Trowbridge y Wandersee (22) |
| Para el desarrollo de tareas cooperativas. | Ontoria y otros (20) Cañas y otros (27, 28) |
| Herramienta o instrumento de evaluación. | Novak (18) Novak y Gowin (19) Kommers y Lanzing (23) Edmondson (21) |

Al final de este capítulo puede consultarse el mapa conceptual (Figura A) el cual sintetiza las las propuestas de Kommers y Lanzing (23).

Diferencias entre “leer y hacer” los mapas conceptuales

Debe distinguirse entre el *proceso de elaboración* de un mapa conceptual y el esquema, como tal, ya terminado. *Leer* un mapa conceptual requiere de algunas instrucciones. El conocer el proceso de elaboración y el que lector tenga la experiencia de haber elaborado algún mapa, sin duda le dotará de más elementos para el análisis y crítica del mapa.

Novak (18) distingue *tres formas básicas de utilizar los mapas conceptuales: a) estrategia, b) método, c) recurso esquemático.*

La utilización de los mapas conceptuales como **estrategia** supone considerar el **aprendizaje** como finalidad y el uso de los mapas estará enfocado a propiciar, facilitar o provocar los aprendizajes. Lo más importante en este caso, es *el proceso de elaboración* y el uso de estrategias y técnicas de aprendizaje y comprensión que los sujetos utilizan para la elaboración de los mapas conceptuales.

En lo que respecta al uso del mapa conceptual como **método**, éste puede combinarse con una serie de actividades de aprendizaje y dinámicas grupales o usarse en tareas que incluyan actividades en colaboración (sean a distancia o presenciales). Novak y Gowin (19) mencionan algunas: la negociación de significados, o bien la posibilidad de actuar sobre el ánimo y disposición de los estudiantes, la confianza, entre otras.

El caso del **recurso esquemático** se refiere tanto a la posibilidad gráfica del mapa como a lo que implica su elaboración, en la cual se dan procesos de síntesis, reconciliación, negociación de significados y aprendizajes, es decir, involucran el nivel cognitivo de los sujetos. El resultado es un *esquema* (con el significado anterior de síntesis) que puede *mostrar explícitamente la síntesis* a la cual se ha llegado. Una vez concluido el diseño puede ser utilizado para guiar una exposición, por ejemplo.

"Elaborar" los mapas conceptuales, una estrategia de aprendizaje.

La elaboración del mapa conceptual pone en juego el uso de diversas *técnicas de aprendizaje*. El proceso de construcción de un mapa conceptual implica que se den ciertos procesos de negociación y reflexión con conocimientos previos de los sujetos. Además, las normas de diseño del mapa conceptual implican no sólo una inventiva y creatividad visual o estética del mismo mapa, sino también estrategias de clasificación, organización y jerarquización de la información que se procesa.

Novak y Gowin (18, 19) fundamentan los mapas conceptuales desde la teoría del aprendizaje de Ausubel, y consideran el proceso de aprendizaje, en el marco de una *teoría general de la educación* que toma en cuenta, además del procesamiento de la información, factores determinantes como los sentimientos, la relación del conocimiento con la experiencia, así como el factor afectivo entre otros.

Lo anterior trae a discusión el mismo concepto de aprendizaje y educación. La propuesta de los mapas conceptuales dentro de un marco educativo como el mencionado, supone favorecer el *aprendizaje significativo*. Novak y Gowin (19) hacen ver que los paradigmas educativos dominantes en la sociedad occidental favorecen el aprendizaje memorístico y que pocos recursos creativos le conceden a los *aprendices* en un ambiente de cambio y de exigencia que propicien cada vez mayores aprendizajes (18).

Algunos autores sitúan el mapa conceptual como una *técnica* (3, 29); otros más le dan el carácter de *estrategia* (18-20, 25, 26).

Esta diferencia deriva de discusiones del ámbito de la psicología sobre cómo se concibe el aprendizaje, pero también del ámbito mismo de la educación, es decir, del contexto y ambiente en los cuales se dan los aprendizajes, así como del uso y aplicación que se le den a los mapas, es decir, si son utilizados como estrategia, método o recurso esquemático.

Una forma de acercarse a este debate es considerar que estrictamente el *diseño* de los mapas conceptuales es una metodología que implica **técnicas de aprendizaje**. Ahora bien, cuando la elaboración de un mapa conceptual se da en un contexto educativo en el cual el alumno adquiere conciencia y además, responsabilidad de sus aprendizajes y éste se encuentra apoyado por un maestro que evalúa procesos de aprendizaje y no tanto los productos, que privilegia el aprendizaje significativo sobre el memorístico, que promociona la reflexión y la crítica sobre la repetición, entonces la elaboración de los mapas puede extender sus aplicaciones, pues no será solamente una técnica de representación de la información, sino un instrumento que permita la autorregulación (25). Para ello, se requiere acompañar el diseño de los mapas con prácticas de evaluación, por parte de los maestros, que estimulen la construcción de *estrategias de aprendizaje para la comprensión y explicación de lo que se estudia*. Si el mapa conceptual es utilizado en un contexto donde se premia y estimula el aprendizaje memorístico, el mapa conceptual se constituye en un estorbo para el estudiante, así como un factor de frustración, pues el trabajo y los aprendizajes que implican su elaboración no serán considerados en las *evaluaciones*.

En la figura 6 se muestra un mapa conceptual que resume la concepción de Beltrán (29) sobre lo que son las estrategias y técnicas cognitivas. Éste es un ejemplo de mapa conceptual utilizado bajo la modalidad de *esquema y resumen para mostrar lo más significativo de un texto o discurso*. Se trata además de un caso particular de mapa conceptual en lo que respecta a su aspecto visual, lo que significa romper con algunas reglas tradicionales del diseño, por ejemplo, la jerarquía conceptual inicia de izquierda a derecha u no de arriba abajo. Se han utilizado otros recuadros que agrupan o conjuntan conceptos que corresponden a la misma categoría, y aunque no tenga la "apariencia" de mapa conceptual, su funcionamiento y la forma en que lee, así como lo que representa lo hacen ser un mapa conceptual, es decir posee los elementos y características de un mapa: jerarquía conceptual y ligas, además de palabras enlace y mostrar los conceptos más significativos. La lectura del mapa conceptual puede hacerse siguiendo las direcciones de las flechas.

Leer y ver los mapas conceptuales

El mapa conceptual, al ser una representación visual, presenta algunas características de la imagen: globalidad y simultaneidad. La *vista* de un mapa conceptual puede brindar información distinta a la de su *lectura*, como por ejemplo la

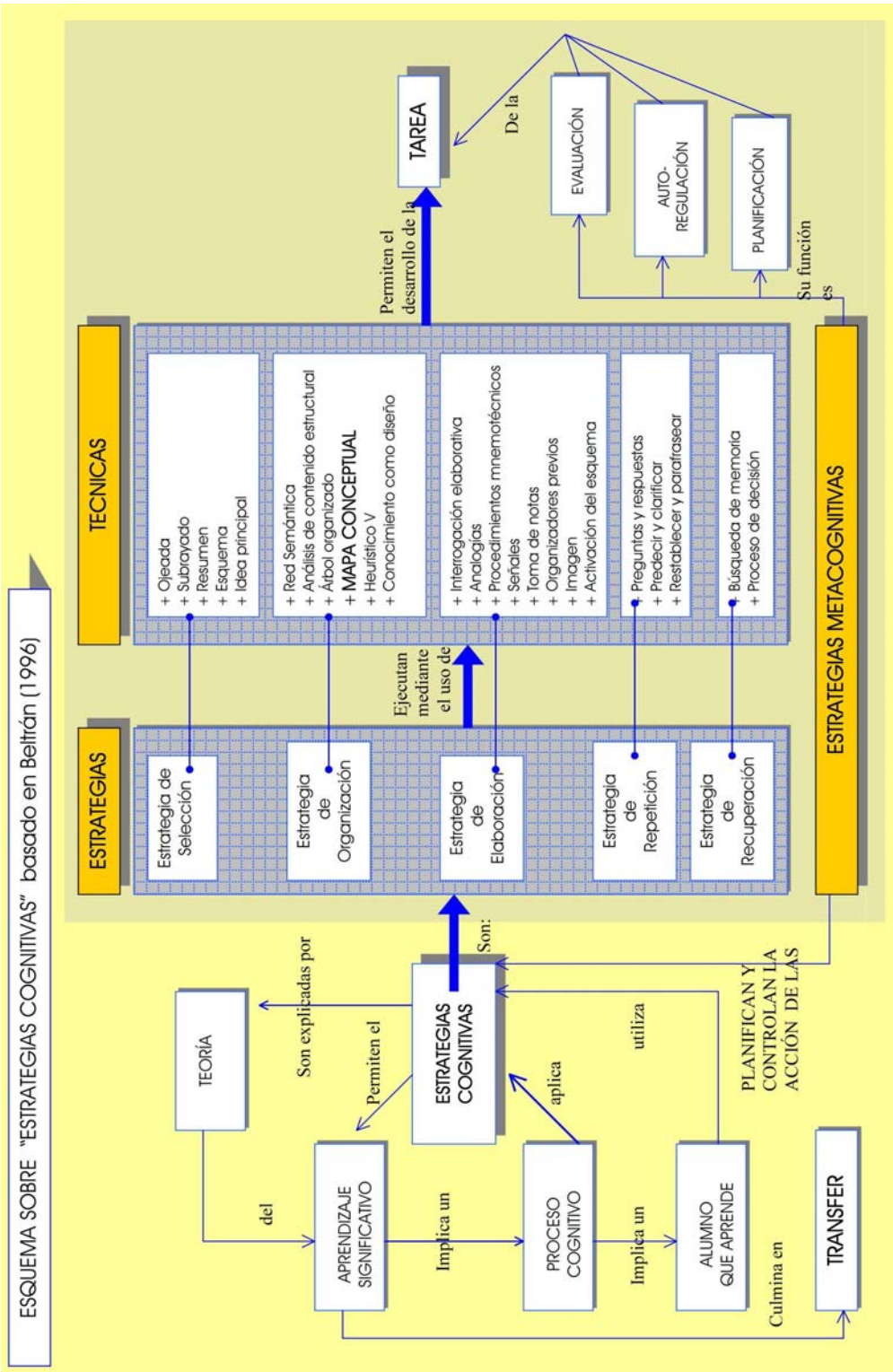


Figura 6. Mapa conceptual "no convencional" sobre la forma en que Beltrán (29) considera las estrategias y técnicas de aprendizaje. Debe notarse el lugar que este autor da al mapa conceptual. Beltrán lo ubica en las Técnicas pero, como una que permite dar paso al uso de Estrategias de Organización.

complejidad de la estructura, la simetría y orden de los conceptos. Podemos usar el ejemplo de *ver* la página de un libro: en ella podemos observar la tipografía, el interlineado, si hay diálogos o no, si los párrafos son muy largos, y otros elementos de diseño; toda esa información *visual* de la página de un libro *no dice nada del contenido* y sin embargo, nos habla del *libro* y probablemente alguna otra información un poco más específica que nos permitiría especular algunas cosas (como por ejemplo, la existencia o no de diálogos puede significar mayor número de voces en el texto o que incluye algunos personajes). El mapa conceptual puede brindar información inmediata aún antes de comenzar su lectura, y una vez comenzada ésta aún conserva aspectos *visuales*, como los mencionados anteriormente, tales como la *globalidad*, pues es posible seguir viendo en conjunto el mapa y el detalle de las tramas conceptuales. Una vez que se conocen las normas generales del diseño de los mapas, el aspecto visual permite *ver* el orden y simetría con la que se exponen las relaciones conceptuales.

La “lectura” del mapa conceptual tiene otras consideraciones aparte de la valoración “estética” del mapa. Esta lectura tiene que ver también con ciertas normativas de diseño del mapa conceptual. De acuerdo con Ontoria (20), pueden distinguirse tres normativas de diseño: jerarquización, selección e impacto visual. El seguir estas normativas de diseño brinda la confiabilidad de representación de mapa conceptual.

La **jerarquización** permite reconocer el lugar y amplitud del uso de un concepto en el contexto que se representa (en el texto); la jerarquización implica el reconocimiento de conceptos más generales o inclusivos, así como los más particulares. Esto implica también la construcción o identificación misma de los límites del concepto y su clasificación.

La **selección** implica el reconocimiento de términos y palabras con un “estatus conceptual”; implica también dejar de lado aquellos conceptos que no sean fundamentales para la construcción de un discurso inteligible. Permite identificar qué conceptos son los fundamentales para comprender aquello que se explica o lee.

El **impacto visual** se refiere a aspectos visuales, es decir una “estética del mapa conceptual”. Esto último no debe pensarse como un accesorio de lujo, pues el impacto visual favorece la lectura: un diseño puede facilitar una lectura más rápida o comprensiva¹¹. Un mapa conceptual con buena presentación, producto de la organización y selección de conceptos, puede favorecer la memoria, aún cuando esto no es el fin del mapa.

¹¹ Esta no es una característica intrascendente. La facilidad de la lectura, y la claridad con la que se encuentren organizados los conceptos son parte de las cualidades y capacidades *representativas, comunicativas y demostrativas* de los mapas. Recuérdese el ejemplo mencionado anteriormente de la “experiencia de lectura”, de acuerdo al uso de códigos alfabéticos como el espacio y puntuación.

Lectura de los mapas conceptuales.

La lectura de un mapa conceptual jerárquico es muy simple. A continuación se presentan los pasos a seguir:

1. Se comienza con el concepto de mayor jerarquía, es decir, el **concepto principal** que se encuentra en la parte superior.
2. Se siguen las líneas o **ligas** que conducen al siguiente concepto. Debe leerse la **palabra enlace**. Las palabras enlaces otorgan sentido a la relación conceptual, lo que se lee es un enunciado.
3. Al llegar al siguiente concepto debe continuarse la lectura siempre y cuando exista un concepto de menor nivel o según lo indiquen las flechas. Las palabras enlace no son siempre bidireccionales, por lo tanto no debe leerse en "sentido contrario" a menos de que exista una doble flecha o, en caso de no existir flechas y si los conceptos se encuentran en el mismo nivel o jerarquía, entonces será posible leer en ambos sentidos la palabra enlace. Generalmente para evitar confusiones en esos casos es mejor indicar con una flecha el sentido de la lectura.

Es posible comenzar la lectura desde cualquier concepto, respetando la dirección de lectura, es decir, en el caso de mapas jerárquicos cuyas ligas no contengan flechas, la lectura se hará de arriba hacia abajo. En caso de que el mapa conceptual contenga ligas con flechas deberán respetarse los sentidos o direcciones indicadas.

Véase el ejemplo siguiente sobre la secuencia de lectura del mapa conceptual. Se presenta en la figura 7 un fragmento de la figura A (mostrada al final de capítulo):

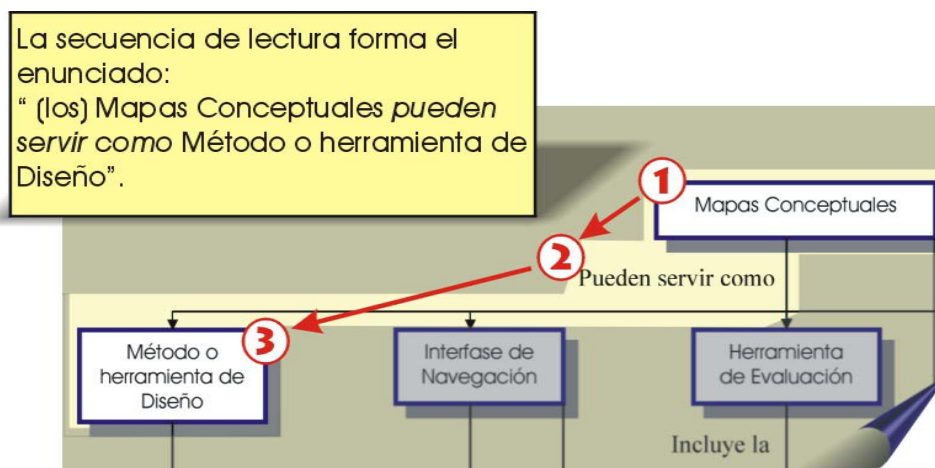


Figura 7. Secuencia de lectura tomando como ejemplo un fragmento de la figura A, que es un mapa conceptual sobre las posibilidades y aplicaciones de los mapas conceptuales, de acuerdo con Kommers y Lanzing (23).

Como se observa en la figura anterior la secuencia de lectura forma el enunciado: "(los) **Mapas Conceptuales pueden servir como Método o herramienta de Diseño**". Este enunciado es una afirmación verdadera. Si se quisiera leer en "sentido contrario" el enunciado quedaría de la siguiente forma: "(el/la) **Método o herramienta de Diseño puede servir como Mapas Conceptuales**". La afirmación anterior, en caso de otorgarle sentido, sería una afirmación falsa.

Como toda lectura de textos, la lectura de un mapa conceptual también está sujeta a interpretación. La comprensión de un texto o mapa no consiste en su memorización o repetición literal. Una interpretación de la lectura de este enunciado puede generar otro enunciado (falso o verdadero), por ejemplo: " Los **métodos y herramientas de diseño pueden optar por utilizar los Mapas Conceptuales**". En la figura 9 se marcan todas las posibles rutas de lectura de un mapa. El fondo borroso corresponde a la Figura A que aparece al final del capítulo.

Estructura de lo mapas conceptuales.

Los mapas conceptuales son recursos esquemáticos que permiten representar de forma gráfica y conceptual, la estructura de un texto o discurso.

El resultado del proceso de elaboración es un "esquema visual" que conocemos como mapa conceptual. Sin embargo, para llegar a un determinado diseño es necesario, por parte de quien lo elabora, realizar distintas actividades cognitivas. Si se trata de la lectura de un libro, implica la comprensión de lo que se dice y su relación con lo que ya se sabe, la selección y jerarquización conceptual y la síntesis de los contenidos. Imaginar o crear el diseño de un mapa implica hacer explícitos los conceptos y sus relaciones. Muchas veces, el acto de escribirlo o hacerlo visible permite reflexionar y negociar significados, que pueden ser provocaciones para que se den nuevos aprendizajes. Las características básicas del mapa conceptual son:

Los **conceptos**. Cuando éstos se encuentran considerados en un mapa conceptual supone que ha sido producto de la identificación de los conceptos principales de la lectura. Una vez organizados en la estructura del mapa conceptual es posible también determinar si los conceptos son de carácter más global o particular. La selección de conceptos implica también la jerarquización y la clasificación, así como la diferenciación entre el caso o evento concreto y el concepto que lo designa.

Al interior del mapa se establecen **ligas o relaciones** entre los conceptos; éstas marcan relaciones directas entre conceptos. Generalmente la mayor cantidad de ligas y relaciones entre conceptos se trazan de forma jerárquica, es decir de arriba hacia abajo conformando una estructura de cascada. Es posible establecer *ligas cruzadas*, las cuales permiten establecer *relaciones* entre conceptos fuera de una *secuencia o cascada*.

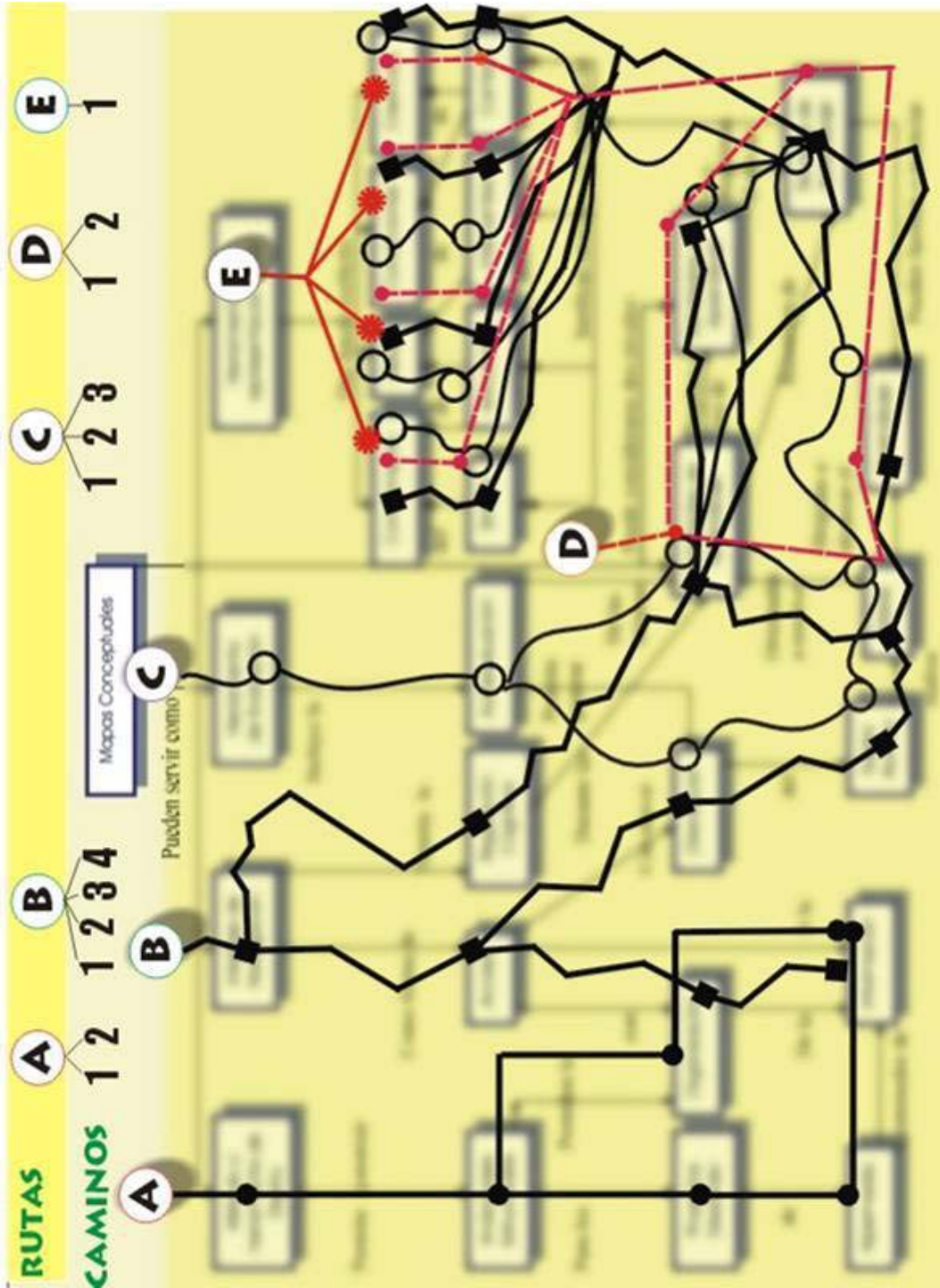


Figura 8. Se muestran todas las posible rutas de lectura del mapa conceptual. Las letras indican los conceptos de los cuales se parte, cada concepto puede ramificar su ruta de lectura y dar lugar a más opciones. Este mapa conceptual puede leerse siguiendo 12 rutas.

Las ligas no bastan para determinar el tipo de relación, entre los conceptos. Esto se logra mediante el uso de **palabras de enlace o conectivos**. Éstos permiten establecer relaciones proposicionales entre los conceptos, lo que permite "leer" un mapa conceptual.

La **jerarquía conceptual** es un elemento importante del mapa conceptual pues permite no sólo clasificar y delimitar el concepto, sino que, de acuerdo al progresivo detalle de los "conceptos que explican otros conceptos", cambian las sentencias proposicionales haciéndose más precavidas, y menos absolutas. La **jerarquía conceptual** permite hacer explícitas las posibilidades del detalle o generalidad de las aproximaciones, así como la flexibilidad de los conceptos al interior de los textos o teorías. Ya que la jerarquía no es fija, ésta puede variar de acuerdo al concepto principal que se desea explicar, de tal forma que puede cambiar los **niveles conceptuales**, cambiar los conceptos relacionados y las palabras enlaces entre ellos.

La figura 9 ilustra mediante un esquema, los elementos y características de diseño de un mapa conceptual.

Proceso de elaboración del mapa conceptual.

A continuación se presenta los pasos que propone Novak (1998) para la elaboración de un mapa conceptual. Se ha optado por transcribir íntegros los pasos del apéndice 1 del libro de Novak: *Conocimiento y aprendizaje*.

CÓMO CONSTRUIR UN MAPA CONCEPTUAL

1. Identificar una pregunta de enfoque referida al problema, el tema o el campo de conocimiento que se desea representar mediante el mapa. Basándose en esta pregunta, identificar de 10 a 20 conceptos que sean pertinentes a la pregunta y confeccionar una lista con ellos. A algunas personas les resulta útil escribir las etiquetas conceptuales en tarjetas individuales o Post-its, para poder desplazarlas. Si se trabaja con un programa de ordenador para construir mapas, hay que introducir la lista de conceptos en él. Las etiquetas conceptuales deben estar compuestas por una sola palabra, o por dos o tres a lo sumo.

2. Ordenar los conceptos colocando el más amplio e inclusivo al principio de la lista. A veces es difícil identificarlos. Es útil reflexionar sobre la pregunta de enfoque para decidir la ordenación de los conceptos. En ocasiones, este proceso conduce a modificar la pregunta de enfoque o escribir otra distinta.

3. Revisar la lista y añadir más conceptos si son necesarios.

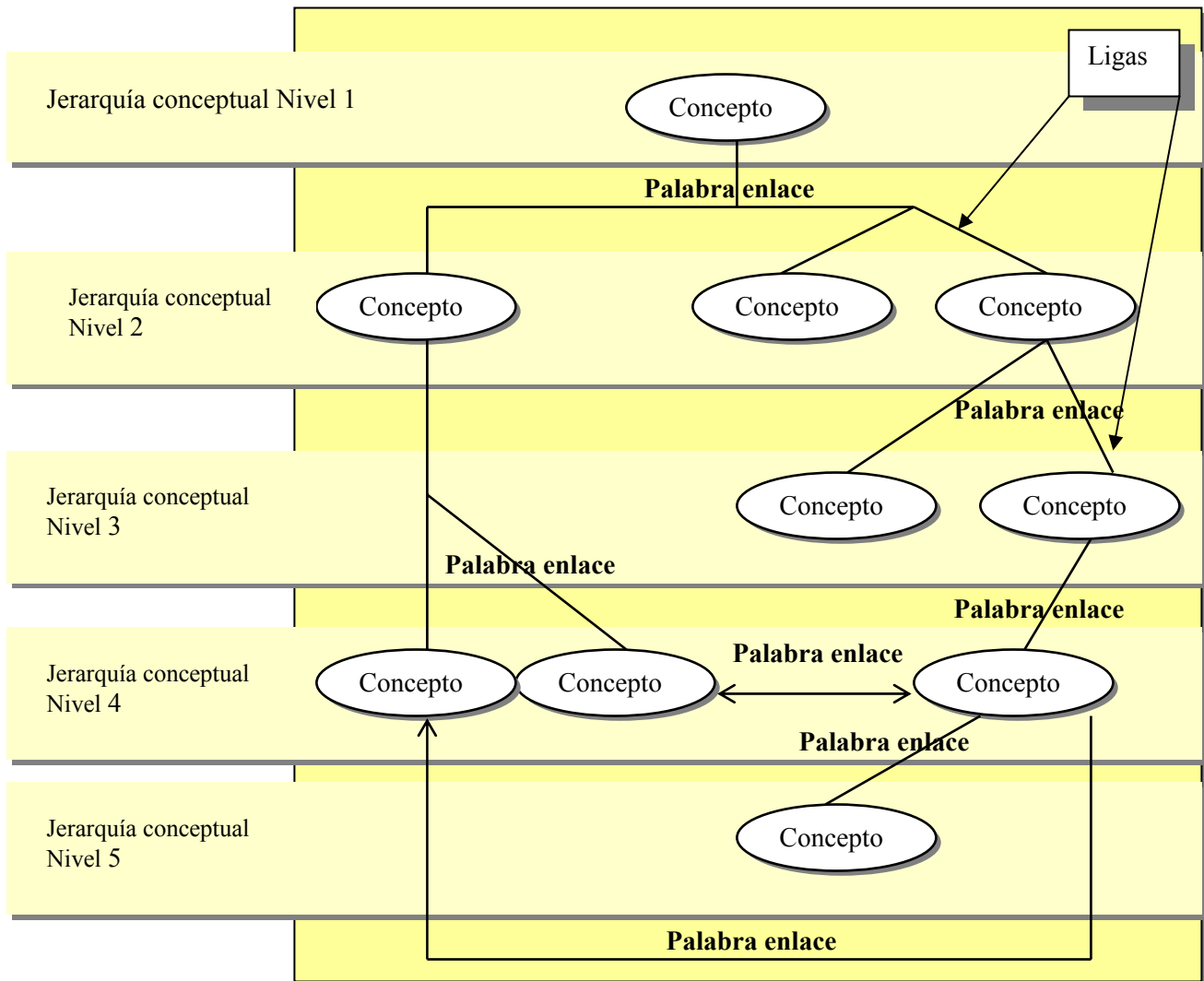


Figura 9. Elementos del mapa conceptual. Se muestra la *jerarquía conceptual*, que en este caso implica 5 niveles. Los *conceptos* se distinguen de las *palabras enlace* porque los primeros se encierran en un óvalo o recuadro. Las *ligas* son las líneas que unen a los conceptos; en ocasiones es necesario e importante marcar "la dirección" de la liga mediante una flecha, ya que esa es la dirección de lectura de la palabra enlace.

4. Comenzar a construir el mapa colocando el concepto o conceptos más inclusivos y generales en la parte superior. Normalmente suele haber uno, dos o tres conceptos más generales en la parte superior del mapa.

5. A continuación, seleccionar uno, dos, tres o cuatro subconceptos y colocarlos debajo de cada concepto general. No se deben colocar más de tres o cuatro. Si hay seis u ocho conceptos que parece que van debajo de un concepto general o de un subconcepto, suele ser posible identificar un concepto intermedio adecuado, creándose, de este modo un nuevo nivel jerárquico en el mapa.

6. Unir los conceptos mediante líneas. Denominar estas líneas con una o varias palabras de unión, que deben definir la relación entre ambos conceptos, de modo que se lea un enunciado o proposición válidos. La unión crea significado. Cuando se une de forma jerárquica un número amplio de ideas relacionadas, se observa la estructura del significado de un tema determinado.

7. Modificar la estructura del mapa, lo que consiste en añadir, quitar o cambiar conceptos supraordenados. Es posible que sea necesario realizar esta modificación varias veces; de hecho es un proceso que puede repetirse de forma indefinida, a medida que se adquieren nuevos conocimientos o ideas. Es ahí donde son útiles los Post-its, o mejor aún, los programas informáticos para crear mapas.

8. Buscar intervínculos entre los conceptos de diversas partes del mapa y etiquetar las líneas. Los intervínculos suelen ayudar a descubrir nuevas relaciones creativas en el campo de conocimientos en cuestión.

9. Se pueden incluir en las etiquetas conceptuales ejemplos específicos de conceptos (por ejemplo, "golden retriever" es un ejemplo de raza canina).

10. Los mapas conceptuales pueden realizarse de formas muy distintas para un mismo grupo de conceptos. No hay una única forma de elaborarlos. A medida que se modifica la comprensión de las relaciones entre los conceptos, también lo hacen los mapas.

Novak, Joseph (1998) *Conocimiento y aprendizaje*. Alianza. España. Págs. 283 y 284.

Ejemplo y ejercicio de elaboración de un mapa conceptual

Considérense las instrucciones de Novak (18) para la elaboración de los mapas conceptuales.

Como ejemplo tomaremos un fragmento de un artículo de Cháñez-Cárdenas (30): “El uso de 1-amilino-8 naftalenosulfonato (ANS), para la identificación de intermediarios en la ruta de plegamiento de proteínas globulares”.

Como primer paso, es necesario determinar el concepto principal a partir del cual se elaborará el mapa conceptual, es decir el *concepto enfoque*.

El concepto de enfoque para realizar el mapa conceptual será: PROTEÍNA.

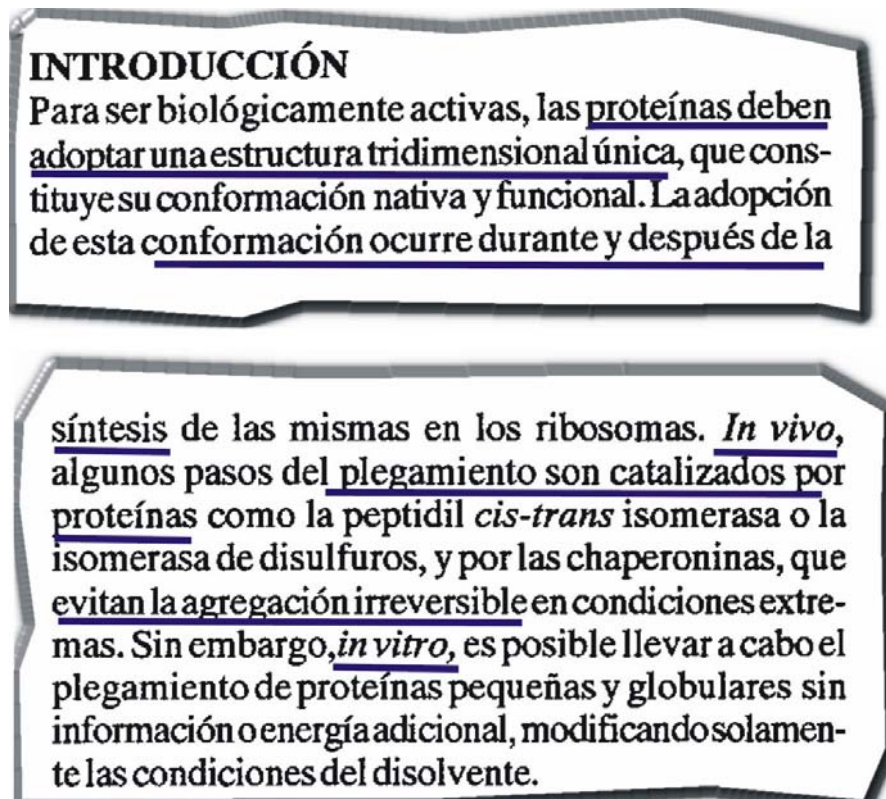


Figura 10. Fragmento de la página 11 del artículo de Cháñez [30].

Al realizar la lectura deben considerarse al menos dos aspectos generales (no son lo únicos):

a) Se puede realizar la lectura para saber de lo que se trata, para conocer la información que presenta y evidentemente para comprender lo que ahí se dice. Esto implica que en el proceso de lectura se reconocerá la temática de la que se trata y cómo se le trata.

b) Otra posibilidad es llegar al texto con intenciones más específicas. Es decir, cuando se consulta un texto al cual se ha llegado con conocimientos previos o buscando una información y explicación precisa. Evidentemente esto también implica reconocer en el texto, los conceptos claves y su comprensión. Sin embargo, es importante hacer la diferencia. De este acercamiento al texto dependerá la pregunta de enfoque principal, es decir, que algunas veces se construye la pregunta, y en otras, como el caso del inciso a), se “descubre” la pregunta de enfoque (¿qué quiere decir el autor?). Esto no es una regla rígida y no agota las posibilidades e implicaciones de la interrogación del texto y su interpretación.

Selección de los conceptos. La identificación de los conceptos no siempre implica que se encuentren escritos de una forma utilizable en los mapas conceptuales, o bien pueden ser referidos de otra forma. Aún cuando no se encuentre *la palabra*, es posible considerar el concepto cuando está implícito en algún párrafo o como parte de un concepto que es utilizado para implicar o referir. En este ejemplo se hace una selección más o menos amplia; recordemos que hemos marcado como concepto clave **PROTEÍNA**.

De acuerdo con el texto marcado, como se observa en las figuras 10, los conceptos que se consideran importantes son:

Tabla de conceptos. Se muestran todos los conceptos que se reconocieron en el texto.

| | |
|---------------------------|------------------------------|
| Proteína | <i>In Vitro</i> |
| Estructura tridimensional | <i>In Vivo</i> |
| Conformación nativa | Plegamiento |
| Conformación funcional | Disolvente |
| Síntesis de proteínas | Peptidil cis-trans isomerasa |
| Ribosomas | Isomerasa de disulfuros |
| Agregación irreversible | Chaperoninas |

Lista y ordenación de los conceptos. Para facilitar la elaboración del mapa conceptual es recomendable hacer algún tipo de clasificación de los conceptos. Esta clasificación puede ser variable de acuerdo a las características del texto. Puede ser jerárquica, por características comunes, semántica, etcétera. La clasificación dependerá del tema que se desee representar.

En este caso, la pregunta de enfoque es **PROTEÍNA**, y el mapa conceptual pretendería ser explicativo de los que implica o significa la **PROTEÍNA**, sin olvidar que la mención de ésta depende del objetivo del texto que se analiza. Es importante mencionar que el proceso de clasificación y jerarquización conceptual implica conocimientos e información más allá del fragmento de texto que se está analizando y es probable que se construyan conceptos adicionales.

Tabla de Conceptos. Se muestran los conceptos agrupados. La agrupación puede ser de carácter semántico o bien de conceptos subordinados. En este caso se muestran ambas posibilidades.

| | |
|------------------------------|---------------------------|
| Proteína | Estructura tridimensional |
| Ribosoma | Conformación nativa |
| Peptidil cis-trans isomerasa | Conformación funcional |
| Isomerasa de disulfuros | Plegamiento |
| <i>In Vitro</i> | <i>In Vivo</i> |
| Isomerasa de disulfuros | Disolvente |

Inicio del mapa conceptual. Una vez hecha la selección y clasificación, se procede a la elaboración del mapa.

El mapa conceptual se iniciará colocando el concepto PROTEÍNA como el concepto de mayor jerarquía, por lo que toda la estructura conceptual tendrá el fin de explicar dicho concepto. Se puede empezar utilizando algún *software* especializado para realizar mapas conceptuales, o el boceto a mano. En la figura 11 se presenta sólo el resultado final. (se realizaron 4 bocetos para determinar qué información podía ser incluida así como cuestiones visuales del mapa, es decir, cómo ordenar espacialmente los conceptos). En la figura 11 se muestra una propuesta elaborada utilizando el programa *IHMC Cmap ToolKit*.

Rediseño y malabares conceptuales

Los mapas pueden tomar formas distintas de acuerdo al concepto principal o pregunta de enfoque, así como aquello que se desee considerar como parte del mapa. Como se observa en el mapa conceptual de la figura 11, se dejaron de lado algunos de los conceptos que se habían detectado en la lectura del texto, y se le dio relevancia a las características más significativas de la PROTEÍNA, considerando que la explicación sobre ella es introductoria y pretende dar algunos antecedentes al lector para abordar el estudio de las *rutras del plegamiento*, por lo que los esquemas *se refieren a texto* y no a una *estructura lógica o didáctica* de explicación sobre las proteínas.

Se ha presentado un ejemplo simple a modo de ilustración que evidentemente no agota las posibilidades.

El mapa fue diseñado en el software llamado "*IHMC CmapToolKit*". Este software permite modificar de forma sencilla las ubicaciones de conectivos y conceptos y también exportar el mapa a una imagen GIF. Esto último permite su uso en la WEB o bien la modificación para una mejor presentación o adición de elementos de diseño que no son posibles en el software.

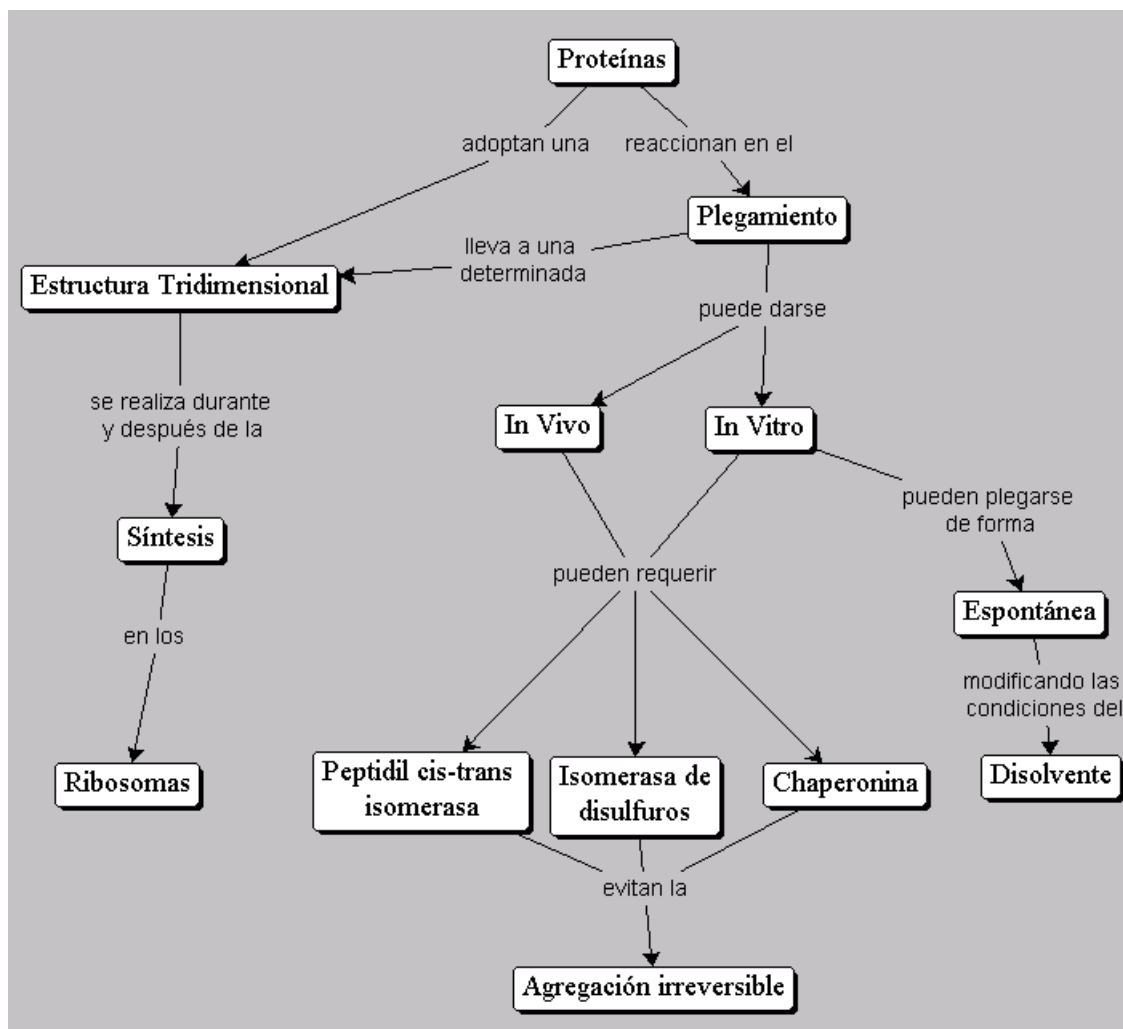


Figura 11. Mapa Conceptual que muestra características principales del concepto **Proteína** según el fragmento de texto mostrado en Fig. 10. Fue diseñado en el *software* para mapas conceptuales llamado: "IHMC Cmap ToolKit".

Libertad y palabras intrusas.

El mapa conceptual es un esquema visual que permite la representación de un contenido o información estructurada cuyo origen la mayoría de las veces, es un texto escrito.

Tanto el texto escrito como el mapa conceptual tienen características que implican lógicas específicas para su elaboración, lectura y comprensión. Cuando se realiza un mapa conceptual con base en un texto no debe olvidarse que se está *interpretando* el texto y *representando* su contenido o información. No se trata de una traducción automática y literal. Esto significa que un mapa conceptual puede estar

equivocado o ser una mala representación de la estructura e información que el texto contiene.

Durante el proceso de elaboración de un mapa conceptual es posible encontrarse con la necesidad de agregar conceptos y conectivos que no se encuentren explícitamente en el texto, pero es posible que estén implícitos en él, pues consideremos que cuando seleccionamos un *fragmento* de un texto éste puede contener referencias a otras partes de él mismo. En otros casos, puede ser que en el fragmento del texto que se analiza se den por explicadas ciertas relaciones conceptuales significativas, pues pudieron ser tratadas con anterioridad. Esto nos advierte que en el proceso de interpretación de un texto y en la elaboración de un mapa conceptual, también deben ser considerados los contextos y referentes.

La interpretación del texto debe conducir al lector a formular sus propios enunciados. Esto permite expresar en el mapa conceptual distintas estructuras conceptuales que no necesariamente deben tener los mismos enunciados del texto. No debe olvidarse que un mapa conceptual puede servir para *comprender y representar lo que dice el texto, aunque caben otras posibilidades* como por ejemplo el *análisis del texto* en el cual, la construcción del mapa conceptual serviría como método de análisis que permitiera descubrir omisiones o errores en el texto sobre el cual se está trabajando.

Otras posibilidades en el uso de los Mapas Conceptuales

Existen ya experiencias sobre el uso de mapas conceptuales como interfases de navegación que regulan el acceso a la información en sistemas expertos y de aprendizaje. Sobre esto puede consultarse el sitio en Internet del *Institute for Human & Machine Cognition* (<http://www.coginst.uwf.edu/>). Ahí se pueden encontrar numerosos artículos sobre experiencias en el uso de los mapas conceptuales.

Las posibilidades de los mapas conceptuales como *organizadores previos* en las actividades de aprendizajes los pueden hacer útiles para su aplicación en: antologías electrónicas, guías de lectura, o en hipertextos de acompañamiento para el estudio de contenidos en libros (17).

El mapa conceptual como guía de lectura

La mayoría de las veces que se utiliza un texto en clase se hace con la intención, por parte del docente, de recuperar *conceptos* importantes que ayudarán al alumno a *comprender* los fenómenos, a analizar o ampliar su *saber teórico* sobre un tema. Se *utiliza* el texto (que puede ser un artículo o libro) para *explicar* o *enseñar* algún tema en específico. En ese sentido, el *texto* es un *recurso de información*, como un *medio de información*, y una *herramienta para el aprendizaje*. Para un lector experto en la materia le será relativamente fácil en la lectura *determinar* o *localizar* los

conceptos claves. Nuestra experiencia docente indica que esto no siempre es tan fácil para un *aprendiz*.

Existen diversas técnicas para ayudar a la comprensión de textos. Algunas proponen la formulación de ciertas preguntas antes de leer, otras presentan preguntas al final de los textos con la idea de obligar y ayudar al lector a recuperar la información más importante en el texto, y algunas técnicas más.

El mapa conceptual puede servir como *guía organizada de lectura* y puede permitir hacer *explícito* aquellos conceptos o informaciones importantes de recuperar del texto, ofreciendo al lector una *referencia* y *recordatorio* de la *intención de la lectura*.

No debe olvidarse que el *mapa conceptual* que se elabore como guía de lectura es una *interpretación del texto*, depende de la *pregunta central planteada*, y responde a las *temáticas y objetivos de un curso*: es una orientación para la lectura.

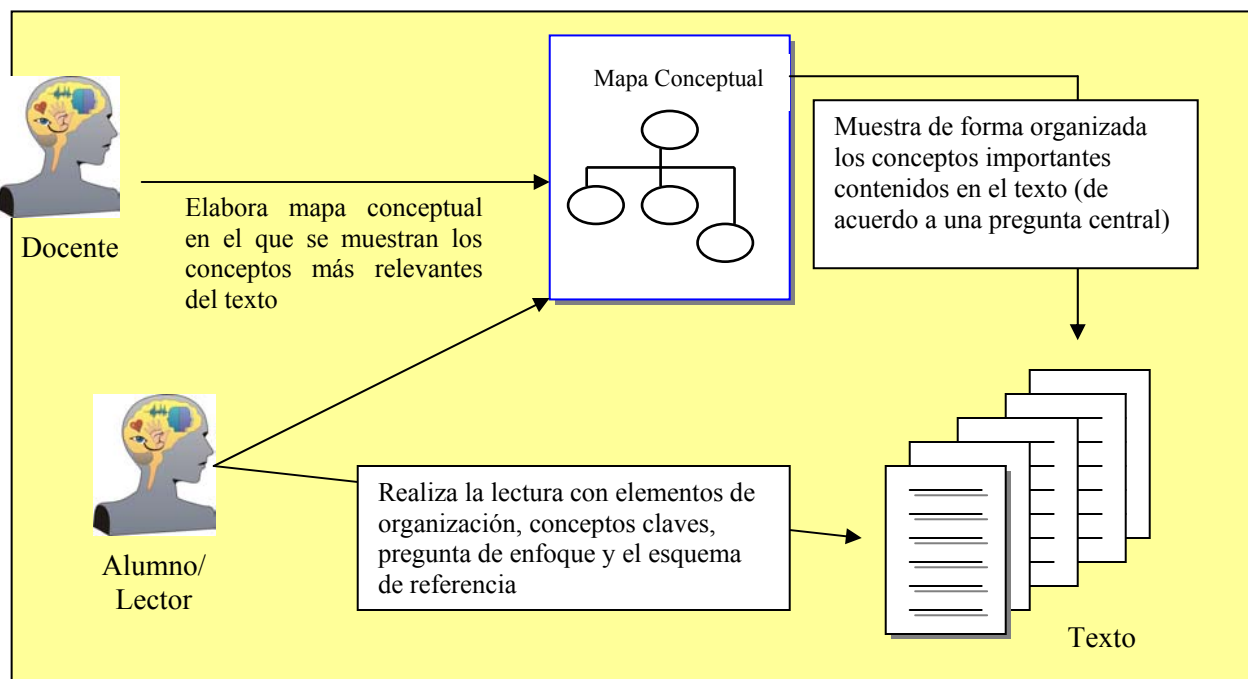


Figura 12. Ejemplo de mapa conceptual.

Este ejemplo no se refiere al uso de los mapas como parte de un material educativo, sino como una propuesta para el análisis de textos.

En este caso se presenta un ejemplo (véase la figura 13) de cómo puede aplicarse un mapa conceptual para descubrir “la densidad” conceptual de un texto. Esto resulta interesante para determinar qué exigencias de conocimientos implica la comprensión de un texto. O bien, para hacer explícita la complejidad conceptual de un texto.

Para el ejemplo se han seleccionado tres párrafos a ser interpretados y representados en un mapa conceptual. La obra es: Castells, Manuel: *La sociedad red*. Siglo XXI. Páginas 40 y 41 (31). (Ver la figura 13). Los dos párrafos seleccionados contienen una gran cantidad de conceptos y la información es compleja. Esto no siempre es evidente, sobre todo cuando se trata de lectores especialistas del área para quienes es fácil comprender los que se dice en los textos especializados o teóricos. Sin embargo, para un lector inexperto en la materia o que carezca de estrategias de interpretación el texto puede presentarse carente de sentido o incomprensible.

Se ha elaborado un mapa conceptual (ver figura 14), a partir de los dos párrafos marcados que se muestran en la figura 13 y es un ejemplo, tanto de las posibilidades del mapa conceptual desde la perspectiva del detalle, como de su uso como una herramienta que permita hacer explícita la cantidad y calidad de la información contenida en el texto y determinar la pertinencia de su uso en determinado contexto.

Herramientas informáticas para la elaboración de mapas conceptuales

El uso de elementos visuales y gráficos son un recurso cada vez más utilizado para *comunicar, exponer ideas, discutir problemas*, e incluso para vender. El interés y, en algunos casos, la *necesidad* por utilizar el *lenguaje visual* (13) no ha pasado desapercibido por las compañías de *software*, y actualmente existe toda una serie de programas especializados. La diversidad es amplia y debe distinguirse en cuanto a los usos y los problemas que pueden ayudar a resolver.

Bajo la idea de *concept mapping* y *visual thinking* se han desarrollado una variedad de programas informáticos que permiten la creación/diseño de diagramas, esquemas y gráficos. La principal característica de este software es la de brindar una plataforma que permita la modificación más o menos simple de los diseños.

Es de suma importancia la *facilidad* de *rediseño* de los diagramas y mapas conceptuales, ya que su elaboración requiere de un *proceso* en el cual se reestructura constantemente el diseño hasta que se llega a un diseño final. Programas como *Microsoft Word, Corel Draw, Microsoft Power Point, Adobe Illustrator* y otros similares, tienen herramientas de diseño y dibujo que pueden ser utilizadas para realizar mapas conceptuales; sin embargo, es sumamente complicado hacer modificaciones al diseño, por ello no son muy útiles cuando es necesario *rediseñar* constantemente los mapas conceptuales. Estos programas pueden servirnos cuando ya se tiene un diseño definitivo y se desea *dibujar* el mapa conceptual o mejorar aspectos visuales o gráficos.

No todos los programas de *concept mapping* permiten hacer **mapas conceptuales**. No debe confundirse los términos. *Concept mapping* se refiere a la *técnica* de representar de forma gráfica ideas, problemas, datos o información, con la finalidad de *representar* los propios conocimientos o para *comunicarlos* o *presentarlos* a otras personas. En esquemas más cercanos al *mapa conceptual*, tal y como le hemos revisado en el documento, la intención de la *estrategia* y *técnica* es la de

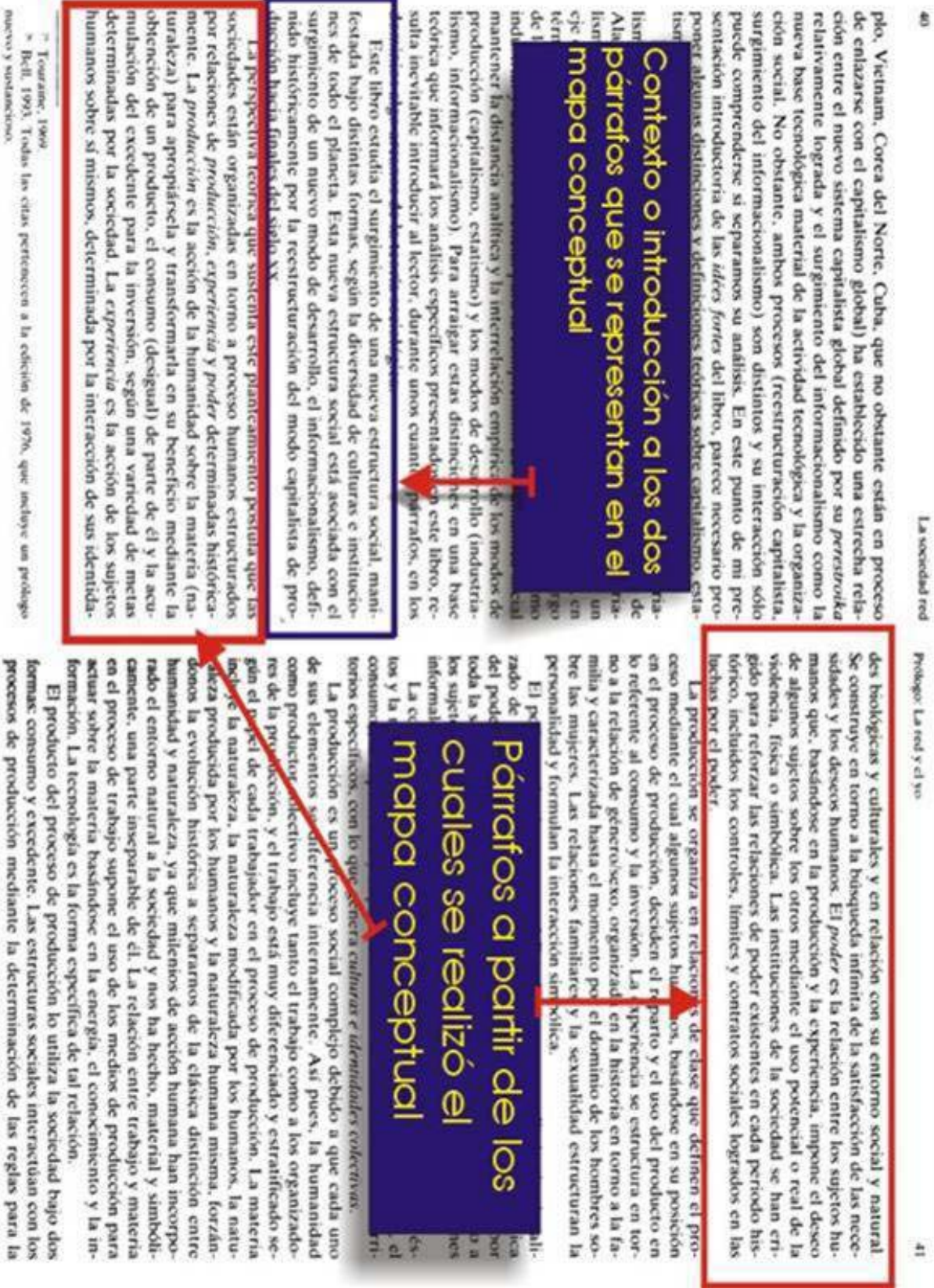


Figura 13. Párrafos seleccionados para la realización del mapa conceptual.

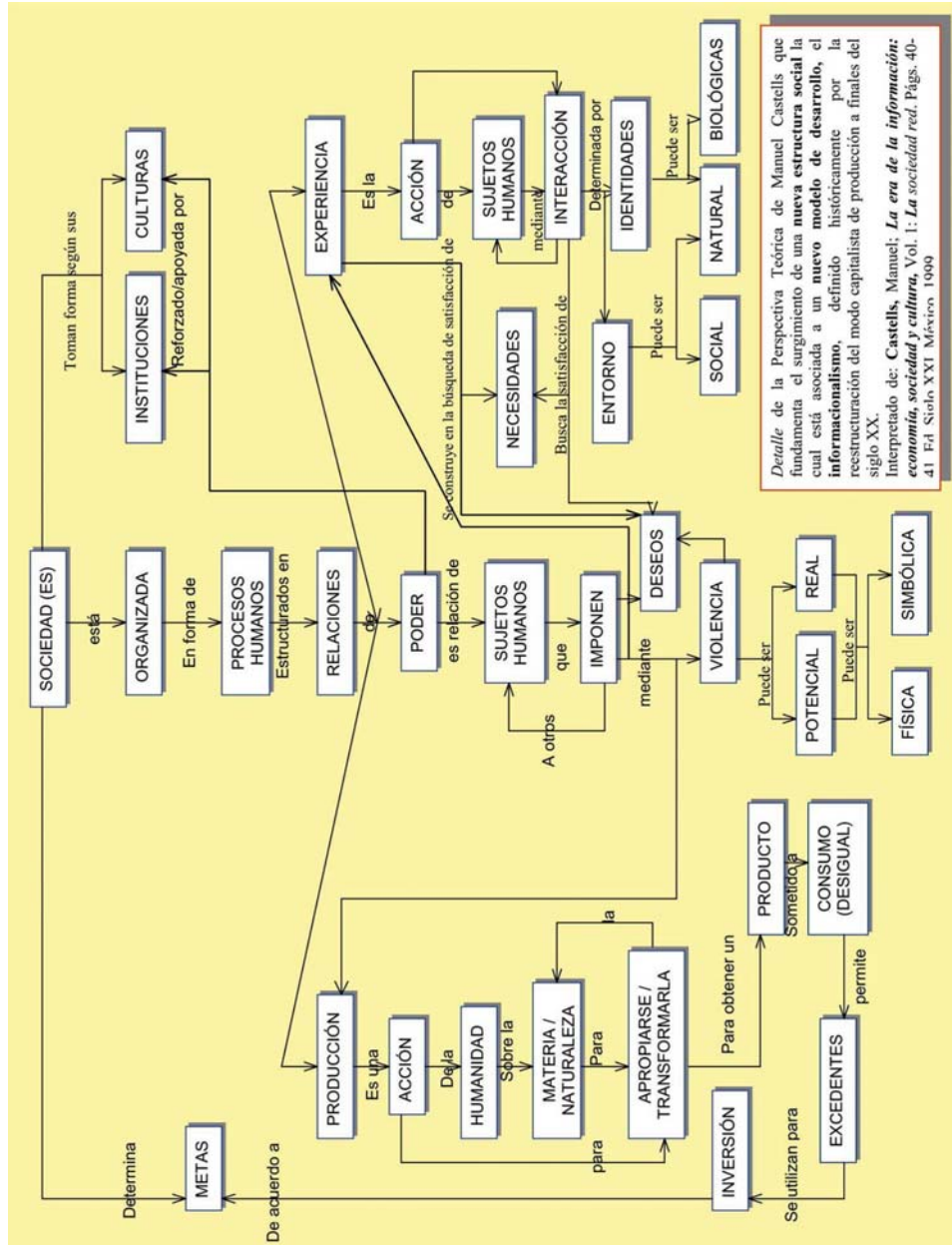


Figura 14. Mapa Conceptual desarrollado a partir de dos párrafos. Este mapa muestra la complejidad del texto, pues exige el conocimiento de variedad de conceptos provenientes de la sociología y la economía. También sirve de ejemplo de las posibilidades de detalle de los mapas conceptuales

representar relaciones significativas entre conceptos en forma de proposiciones (18-20, 32, 33). En un ámbito fuera de lo educativo o pedagógico, generalmente la técnica no se interesa por el proceso de aprendizaje ni por la evaluación del mismo.

Las técnicas de *concept mapping* abarcan variedad de diseños. Se presenta en este apartado, una selección de herramientas informáticas especializadas en el *mapeo de conceptos*: algunas de ellas son especializadas para la creación de mapas conceptuales, algunas otras ofrecen la posibilidad de realizar otro tipo de esquemas como *mapas mentales, diagramas de pez, diagramas de flujo, metáforas visuales, redes mentales, diagramas de telaraña*, entre otros¹².

Es importante aclarar que, algunos programas fueron desarrollados por institutos de investigación y por universidades, cuya finalidad era apoyar el aprendizaje y la enseñanza. Otros provienen o están dirigidos a aplicaciones comerciales, ventas o trabajo en organizaciones. Estos orígenes, y los públicos a los que se dirigen, dotan de particularidades a los programas que se presentan.

⇒ **CMapp Toolkit** (Institute for Human & Machine Cognition)

Dirección de Internet: <http://www.coginst.uwf.edu>

En este sitio se puede bajar el programa: "Cmap Toolkit". Este *software* está disponible de forma gratuita y existen versiones para Windows, Macintosh, Solaris y Linux.

El aspecto visual (interfase gráfica) del Cmap Toolkit no es muy llamativo, sin embargo, es una aplicación muy funcional y especial para la creación de mapas conceptuales. Los resultados de los mapas conceptuales no son muy vistosos, pero es muy fácil su modificación y edición, lo cual es de suma importancia cuando se trabaja en proyectos que requieren la constante revisión y actualización de los diseños.

Un gran potencial del Cmap ToolKit es la posibilidad de realizar *mapas en colaboración*. El *Institute for Human & Machine Cognition* ofrece el servicio de *hospedaje* para el desarrollo de mapas conceptuales colaborativos. Su uso es automático y basta definir al inicio de un proyecto si el mapa conceptual será local o en red.

Una característica más es la posibilidad de realizar *hipervínculos* en los mapas conceptuales. Esto posibilita el *ligar o relacionar* mapas conceptuales con otros mapas

¹² Sobre diferentes tipos de *diagramas y mapas de conceptos, incluidos los mapas conceptuales* puede consultarse: Ontoria, A., Gómez, J.P.R y Molina, A. (26). En este texto se revisan: *supernotas, mapas conceptuales, mapas mentales, redes conceptuales, y mapas semánticos*. Además de la descripción de la técnica se ofrecen algunas reflexiones y propuestas para utilizarse en el salón de clases y, en algunos casos, para su uso en la evaluación de los aprendizajes.

conceptuales o con una información en específico que puede ser texto, imagen, sonido y video.

El Cmap Toolkit es un *software* para trabajo de todos los días, y aunque no ofrece una muy buena presentación final para utilizar los diseños en publicaciones o presentaciones, una vez obtenido el diseño en este software puede simplemente *dibujarse* en cualquier programa de diseño como Corel Draw o incluso en *Microsoft Word*. Un aspecto que debe considerarse es que el *software* está en Inglés, aunque su operación es sencilla por lo que los inconvenientes podrán ser superados con el uso del programa.

El Cmap Toolkit ha sido utilizado en una variedad de proyectos de hipertexto educativo. En el sitio de la Internet pueden consultarse las experiencias y los artículos.

☞ **Axon Idea Processor**

Dirección de Internet: <http://web.singnet.com.sg/~axon2000/index.htm>

La principal aplicación del *Axon Idea Processor* es el área de negocios, área creativa y toma de decisiones y su utilidad está precisamente en esta última. Está diseñado para trabajar en Microsoft Windows y en idioma inglés.

Los principales tipos de gráficos que permite generar son: *mapas mentales*, árboles de decisiones y una variante de mapas conceptuales (la estructura y diseño no son los mismos que el que se han desarrollado en este trabajo), diagramas PERT, entre otros. Ofrece la posibilidad de utilizar bases de datos, fichas y notas así como hipervínculos y funciones avanzadas. La mayoría de ellas puede ser útil para relacionar ciertos datos e información.

El *Axon* utiliza conceptos de diseño gráfico para determinar colores, formatos, composición o diseño; pueden resultar atractivos, pero no todas las propuestas desde el diseño son “compatibles” con los fines de la enseñanza o el aprendizaje

Se ofrece una versión de prueba en el sitio de Internet. Su utilidad puede ser evaluada por el usuario. A juicio nuestro, su aplicación en mapas conceptuales es reducida.

Otro programas similares aunque menos versátil es: **Decisión Explorer** (www.banxia.com)

☞ **Inspiration**

Dirección de Internet: <http://www.inspiration.com>

Inspiration permite la creación de mapas conceptuales, mapas mentales, redes semánticas y otros tipos de esquemas más. Este software se ofrece en dos versiones:

Kidspiration, una versión para niños e *Inspiration* para mayores de 12 años. También ofrece algunas otras herramientas independientes para desarrolladores y maestros.

En el sitio de Internet es posible obtener un programa de demostración que expira a los 30 días. La mayoría de la opciones del programa están habilitadas. Se dispone de versiones para Windows y Mac.

Es un programa de fácil uso y las modificaciones de los diseños son muy simples; es muy recomendable para el desarrollo de mapas conceptuales y esquemas similares. Cuenta con “plantillas” que pueden servir para control de experimentos, registro de datos, fichas de lectura y otros formatos que pueden resultar útiles.

↗ SEMNET

Dirección de Internet: <http://www.2learn2.com/courses/semnet.html>

Fue desarrollado por un grupo de investigadores interesados en mejorar los aprendizajes de los estudiantes, SEMNET pretende ser una herramienta que facilite la organización de la información y el trabajo colaborativo. Desde su origen está orientado a crear un ambiente hipertextual y permite varios soportes como: texto, imágenes, gráficos, sonidos y video.

Permite realizar esquemas que combinan las redes semánticas y los mapas conceptuales. Por nuestra parte queda pendiente el conocer sobre aspectos de facilidad de uso y de edición de los proyectos, aunque goza de prestigio académico y de alta aceptación y se han realizado ya algunas evaluaciones serias sobre los resultados del uso del software.

↗ MIND Manager

Dirección de Internet: <http://www.cartografiamental.com>

Permite principalmente desarrollar mapas mentales y está enfocado al desarrollo de la creatividad y la superación personal. En el sitio de Internet se ofrece una versión de prueba para evaluación del producto

Este programa no presenta muchas posibilidades para utilizarse en la construcción de mapas conceptuales. Un caso similar es el de los siguientes productos:

● **Mindjet Visual Thinking** (<http://www.mindjet.com>) Enfocado principalmente a los negocios y áreas creativas; permite realizar mapas mentales de varias ramas y de colores y figuras vistosas. No permite hacer otro tipo de esquemas.

● **VisiMap** (<http://www.coco.co.uk/prodvm.html>) Permite elaborar *mapas visuales*, los cuales son una variante de los *mapas mentales*; enfocado a negocios y empresas. Disponen en línea de un demo de 30 días para evaluación del producto.

● **Smart Ideas** (<http://www.smarttech.com/smartideas/>) Permite manejar distintas figuras e ilustraciones para elaborar esquemas, realizar mapas conceptuales y otro tipo de esquemas. Es posible establecer hipervínculos en los conceptos y esto permite obtener más profundidad del tema.

Los resultados en términos gráficos no son muy buenos. Falta por evaluar los aspectos relativos a la facilidad de modificación de los diseños. En el sitio de Internet puede obtenerse una versión de prueba para evaluación del producto.

↗ **Microsoft Visio**

Dirección de Internet : (<http://www.microsoft.com>) Permite realizar gran cantidad de tipo de diagramas, cubre la gran mayoría de los mismos y es de fácil uso. En algunos casos, las herramientas de dibujo son poco flexibles y es difícil modificar ciertas formas de líneas, lo mismo pasa con las etiquetas (palabras) que no es posible moverlas de lugar porque éstas van fijas y determinadas a una línea o posición de ésta. Permite establecer hipervínculos y fondos; incluye una biblioteca de imágenes no muy versátiles y la mayoría de objetos relacionados con computadoras y algunas metáforas visuales tipo MS Office.

En general es una herramienta versátil y compatible con la mayoría de los formatos de Microsoft Office; sin embargo, si lo que se quiere es hacer mapas conceptuales es preferible una herramienta especializada como *Inspiration* o *Cmap Toolkit*.

REFERENCIAS

1. Negroponete, Nicholas (2000) *El mundo digital*, España: Biblioteca de Bolsillo.
2. Pozo Municio, Juan Ignacio (1996): *Aprendices y maestros: La nueva cultura del aprendizaje*, Madrid: Alianza.
3. Burbules, N.C. y Callister, Thomas A. (2001) Educación: Riesgos y promesas de las nuevas tecnologías de la información, Granica, España.
4. Spiegel, D. (1997) *La escuela y la computadora*, Ediciones Novedades Educativas, Argentina.
5. Landow, George P. (1995) *Hipertexto: La convergencia de la teoría crítica contemporánea y la tecnología*, Paidós: España.
6. Kerckhove, Derrick (1999a), *La piel de la cultura. Investigando la nueva realidad electrónica*. España: Gedisa.
7. Simone, Raffaele (2001) *La tercera fase: Formas del saber que estamos perdiendo*, Taurus, España.
8. Britt, M. Anne y Gabrys, Gareth L. (2000) "Teaching Advanced Literacy Skills for the World Wide Web" en: Wolfe, Christopher R. *Learning and Teaching on the*

- World Wide Web*. Estados Unidos de Norteamérica: Academic Press. (págs. 73-90).
9. Kerckhove, Derrick (1999), *Inteligencias en conexión. Hacia una sociedad de la Web*. España: Gedisa.
 10. Nunberg, Geoffrey (1998) *El futuro del libro: ¿Esto matará eso?*, Paidós, España.
 11. Sartori, Giovanni (1998) *Homo videns: La sociedad teledirigida*, Taurus, México.
 12. Tufte, Edward R. (2000) *Visual Explanations. Images and Quantities, Evidence and Narrative*. Graphics Press. Estados Unidos de Norteamérica.
 13. Horn, Robert (1998) *Visual language: Global communication for the 21st. Century*, MacroVu Inc., Bainbride Islan, Washington.
 14. Jonassen, David H. (2000) *Computers as Mindtools for schools: Engaging Critical Thinking*. Prentice-Hall. Estados Unidos de Norteamérica.
 15. Cabero J (1999), "Tecnología Educativa: diversas formas de definirla" en Cabero, J. (ed.), *Tecnología educativa* (pp. 17-50). Madrid: Síntesis Educación.
 16. Cabero, J. (2001), *Tecnología educativa: Diseño y utilización de medios en la enseñanza*. Barcelona: Paidós.
 17. Aguilar Tamayo, Manuel F (2002) "Mediador Hipertexto, una propuesta para facilitar la comprensión de textos". En INFODEX (coordinador) *Educación. Retos de la alfabetización tecnológica en un mundo en Red*. España: Junta de Extremadura.
 18. Novak, Joseph D. (1998): *Conocimiento y aprendizaje. Los mapas conceptuales como herramientas facilitadoras para escuelas y empresas*, Madrid: Alianza Editorial.
 19. Novak, Joseph D. y Gowin, D. (1988) *Aprendiendo a aprender*, Barcelona-España: Martínez Roca.
 20. Ontoria, A., et al. (2000): *Mapas conceptuales: una técnica para aprender*, Madrid: Narcea, 10ª ed.
 21. Edmondson, Catherine (2000) "Assessing science understanding through concept maps". En En Mintzes, Joel J., Wandersee, Jame H., Novak, Joseph D. *Assessing Science Understanding. A human constructivist view*. Estados Unidos de Norteamérica: Academic Press. (págs. 15-40).
 22. Trowbridge, John E. y Wandersee, James H. (1998) "Theory-driven graphic organizers". En Mintzes, Joel J., Wandersee, James H., Novak, Joseph D. *Teaching science for understanding, A human constructivist view*. Estados Unidos de Norteamérica: Academic Press. (págs. 95-131).
 23. Kommers, Piet y Lanzing, Jan (1998): "Mapas conceptuales para el diseño de sistemas de hipermedia. Navegación por la Web y autoevaluación" (pp. 104-127). En: Vizcarro, C. León, José A.: *Nuevas tecnologías para el aprendizaje*, Madrid: Pirámide.
 24. Cañas, A. J., Ford, K.M., Coffey, J. C. (1994) Concept Maps as a Hypermedia Navigational Tool, Seventh Florida Artificial Intelligence Research Symposium, Pensacola, FL (2).
 25. McAleese, Ray (1998): "Mapas conceptuales y adquisición del conocimiento: un enfoque cognitivo" (pp. 177-190). En: En: Vizcarro, C. Y León, José A.: *Nuevas tecnologías para el aprendizaje*, Madrid: Pirámide.

26. Ontoria, A., *Et Al.* (2000b) : *Potenciar la capacidad de aprender y pensar*, Madrid: Narcea, 2^a ed.
27. Cañas, A. J., K. M. Ford, J. Brennan, T. Reichherzer, P. Hayes.(1995). Knowledge Construction and Sharing in Quorum, 7th World Conference on Artificial Intelligence in Education, Washington DC.
28. Cañas, A. J. K. M. Ford, P. J. Hayes, T. Reichherzer, N. Suri, J. Coffey, R. Carff, G. Hill (1997). Colaboración en la Construcción de Conocimiento Mediante Mapas Conceptuales, Memoria del VIII Congreso Internacional sobre Tecnología y Educación a Distancia, San José, Costa Rica.
29. Beltrán Llera, Jesús (1996): "Procesos cognitivos y soportes tecnológicos" (pp. 63-85). En: Tejedor, F.J., Valcárcel.
30. Chánez Cárdenas, Maria Elena (1998) ""El uso de 1-amilino-8 naftalenosulfonato (ANS), para la identificación de intermediarios en la ruta de plegamiento de proteínas globulares". Boletín Educación Bioquímica (México) 17: 11-17
31. Castells, Manuel (1999) *La era de la información: Economía, sociedad y cultura. Volumen I: La sociedad Red*. Siglo XXI. México.
32. Abbey, Beverly (2000) *Instructional and Cognitive Impacts of Web-Based Education*, Estados Unidos de Norteamérica: Idea Group Publishing.
33. Jonassen, D. H., Beissner, K. Yacci, M. (1993) * *Structural knowledge : Techniques for representing, conveying, and acquiring structural knowledge*, Lawrence Erlbaum Associates, Estados Unidos de Norteamérica.

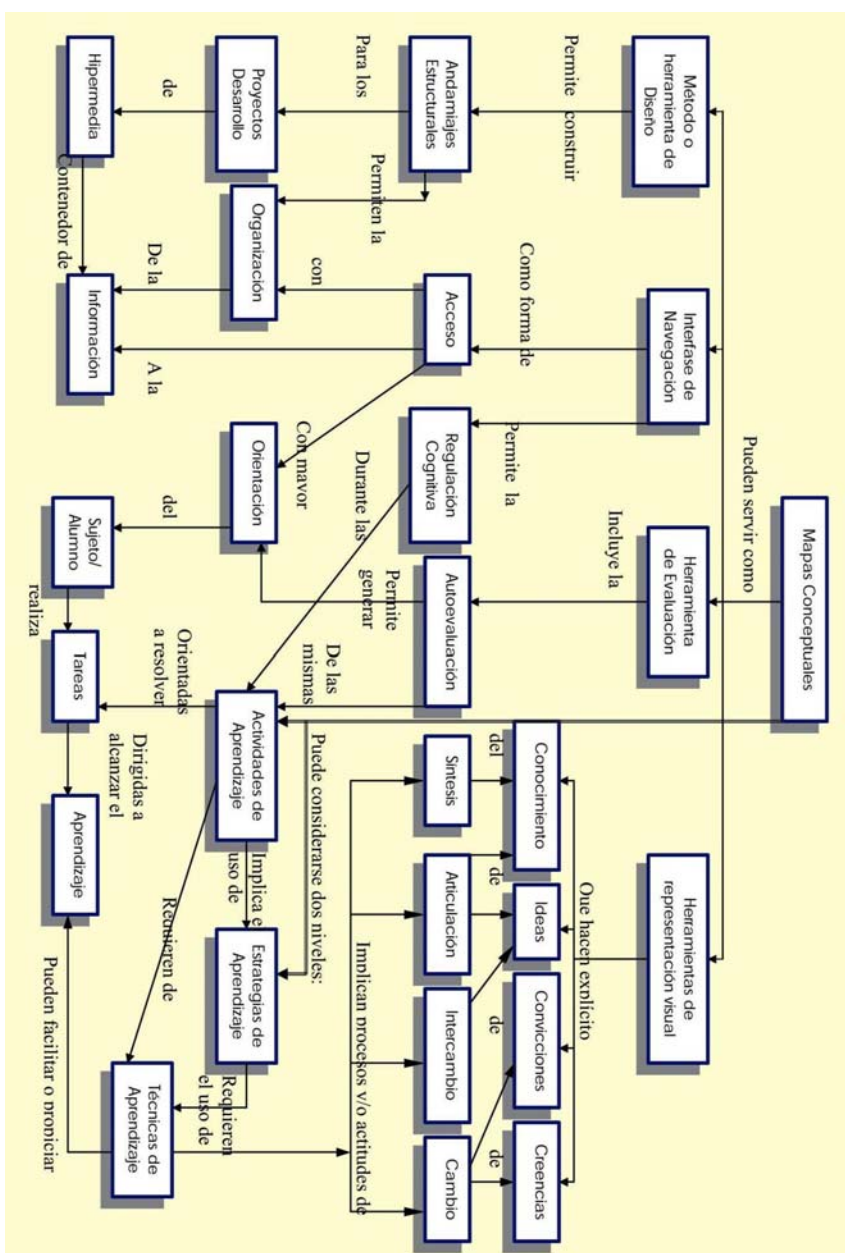


Figura. A. Mapa conceptual que representa las propuestas de Kommers y Lanzing (1998) sobre las posibles aplicaciones de los mapas conceptuales. Como se observa, el mapa no sólo presenta las aplicaciones sino también representa el funcionamiento y contexto teórico que los sustentan.