



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

Facultad de Medicina



Mensaje Bioquímico

**Editores: G. Álvarez, I. Bustos, C. Castañeda,
J. Guevara, I. Romero, H. Vázquez**



MENSAJE BIOQUÍMICO

EDITORES:

**GEORGINA ÁLVAREZ FERNÁNDEZ
ISMAEL BUSTOS JAIMES
CRISTINA CASTAÑEDA PATLÁN
JORGE GUEVARA FONSECA
IRMA ROMERO ÁLVAREZ
HÉCTOR VÁZQUEZ MEZA**

ORGANIZADO POR:

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

VOL. XXXIV

2010

ÍNDICE

Editorial	VII
Agradecimientos	IX
Programa	X
La inauguración de la Universidad Nacional de México y el nacimiento del espíritu universitario Raúl González Lezama	XV
Importancia de las uniones estrechas en los epitelios: El papel de las claudinas Verónica E. Zavala Zendejas y Erika P. Rendón Huerta	1
Aspectos bioquímicos, estructurales y funcionales de las galectinas en la inmunidad. Gerardo R. Vasta	17
La genética de poblaciones prehispánicas mexicanas y su importancia María de Lourdes Muñoz, Gerardo Pérez-Ramírez, Álvaro Díaz-Badillo, y María Concepción Morales Gómez	31
Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas Juan Carlos Martínez-Lazcano, Ma. Catherine Boll-Woehrlen, Ma. de la Paz Alejandra Hernández-Melesio, Moisés Rubio-Osornio, Ma. Alicia Sánchez-Mendoza, Camilo Ríos y Francisca Pérez-Severiano	43
Estabilidad cinética de proteínas Andrea Gutiérrez-Quezada y Miguel Costas	61
Origen y evolución de los virus: ¿Genes errantes o parásitos primitivos? Antonio Lazcano Araujo	73
El papel de la mitocondria en la respuesta inmune Francisco Javier Sánchez García, Fabiola Claudio Piedras y Edgar Abarca Rojano	85
Funciones extratiroideas del yodo Brenda Anguiano	93
Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitotróficas, relevancia ambiental y biotecnología Jesús Espinosa Márquez, Sergio Revah y Sylvie Le Borgne	101

Bioquímica de la selenocisteína, el 21 ^{er} aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana Gustavo Salinas	121
Ingeniería de proteínas y evolución dirigida Lorenzo Segovia y Mariana Peimbert	135
Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos Daniel Limón, Alfonso Díaz, Liliana Mendieta, Félix Luna, Edgar Zenteno y Jorge Guevara	143
Anexo. Nuevos enfoques metodológicos	155
Análisis de la expresión genética <i>in situ</i> con el microscopio de fuerza atómica Luis Felipe Jiménez-García, Alma Zamora-Cura, Nadia Gutiérrez-Quintanar, Ernesto Villalobos-Nájera y María de Lourdes Segura-Valdez	157
FRET: Aplicaciones en la biomedicina Robert Dunakin	165
Técnicas de microcalorimetría para el análisis de proteínas Luis Sánchez	166
Señalización, fosforilación y caracterización de péptidos y proteínas por espectrometría de masas Deckar Enrique Rojas	167
Análisis de proteínas por <i>western blot</i> Enrique Santos	170
<i>Mass Spectrometry Imaging</i> (MSI) para análisis moleculares en tejidos: proteínas y lípidos Deckar Enrique Rojas	171

Mensaje Bioquímico Vol. XXXIV

D.R. © 2010 por Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D. F.
Facultad de Medicina

ISSN-0188-137X

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

Impreso y hecho en México
Printed and made in Mexico



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXXIV, 2010**. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

EDITORIAL

La Universidad Nacional Autónoma de México desde sus inicios ha fomentado valores importantes que han permitido mejorar la calidad de vida de su comunidad. La honestidad, la responsabilidad, el respeto, la tolerancia, la enseñanza, entre otros, son valores que aún rigen en nuestra máxima casa de estudios, gracias a su autonomía, su libertad de cátedra y la convivencia pacífica y leal entre las autoridades académicas y la población estudiantil.

En la actualidad la Universidad tiene un gran prestigio nacional e internacional. Esta casa de estudios sigue siendo la mejor de nuestro país y de Latinoamérica.

A lo largo de 100 años la Universidad Nacional ha contribuido al desarrollo del conocimiento en el ámbito social, humanístico y cultural, pero al mismo tiempo ha permitido la formación de profesionistas comprometidos con la solución de problemas que enfrenta nuestro país. La ciencia y la tecnología son dos áreas en las que también el conocimiento generado ha sobrepasado metas importantes y en particular para mejorar la salud humana.

En este año 2010, se realizan una serie de actividades en honor a los primeros 100 años de vida de la Universidad Nacional. En particular, el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina celebra su XXXVII Taller de Actualización Bioquímica cuyo objetivo primordial es la difusión del conocimiento actual de la Bioquímica.

El contenido de esta revista titulada **Mensaje Bioquímico**, de edición anual, hace referencia a los temas que los conferencistas del Taller de Actualización Bioquímica han presentado a la comunidad científica. Cabe resaltar que esta revista cuenta con el nuevo formato establecido para las revistas científicas y arbitradas de la Universidad Nacional.

Dentro de los investigadores que participan en el Taller tenemos en primer lugar a la **Dra. Erika Rendón**, quien es miembro del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM y en esta ocasión presenta el conocimiento actual sobre las Claudinas, proteínas ubicadas en las Uniones estrechas de las células epiteliales: aspectos básicos y clínicos.

Este año, contamos con la presencia del **Dr. Gerardo R. Vasta** del Center of Marine Biotechnology, de la Universidad de Maryland, EUA. El **Dr. Vasta** ha trabajado durante muchos años sobre la bioquímica de las galectinas en el desarrollo y en la inmunidad y presenta un panorama general su trabajo de investigación. En el mismo campo de la inmunología, el **Dr. Javier Sánchez García** de la Escuela de Ciencias Biológicas del IPN da un enfoque diferente de la mitocondria y su papel en la respuesta inmune.

En este Taller también se tratan temas relacionadas al metabolismo celular a diferentes niveles de complejidad. Por una parte la **Dra. Sylvie Le Borgne** de la UAM-Cuajimalpa habla del metabolismo del azufre y su relevancia en bacterias y por otro lado, el **Dr. Gustavo Salinas** del

Instituto de Higiene, de Montevideo, Uruguay, habla acerca de un "nuevo" aminoácido y su papel en la salud humana; así mismo, la **Dra. Brenda Anguiano**, del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Querétaro, hace una exposición de las funciones del yodo fuera de la tiroides.

En el ámbito del estudio de las proteínas contamos con la participación de dos investigadores de la UNAM, el Dr. **Miguel Costas** de la Facultad de Química quien da un mejor enfoque de la estabilidad cinética de las proteínas y el **Dr. Lorenzo Segovia** del Instituto de Biotecnología, quien nos presenta las bases sobre la Ingeniería de proteínas y la evolución dirigida.

Contamos con la presencia del profesor- investigador de la Facultad de Ciencias de la UNAM, el **Dr. Antonio Lazcano** que de una manera amena nos trata el tema del Origen y evolución de los virus: ¿genes errantes o parásitos primitivos?

Acerca de los radicales libres, la **Dra. Francisca Pérez** del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS destaca el papel de estas moléculas en las enfermedades neurodegenerativas. Por su parte, el **Dr. Daniel Limón**, nos presenta a los Flavonoides como moléculas neuroprotectoras y sus efectos farmacológicos.

Finalmente, la **Dra. Lourdes Muñoz**, del Departamento Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, IPN presenta cómo el Análisis genético del DNA mitocondrial permite analizar poblaciones prehispánicas mexicanas.

En este año, el comité organizador, decidió incluir una serie de conferencias acerca de nuevos enfoques metodológicos. El **Dr. Luis Felipe Jiménez**, investigador de la Facultad de Ciencias de la UNAM, habla del análisis de la expresión *in situ* con el microscopio de fuerza atómica; La empresa **AB Sciex** presenta dos temas: 1) Señalización, fosforilación y caracterización de péptidos y proteínas y 2) *Mass Spectrometry Imaging* (MSI) para análisis molecular en tejidos. Por otro lado, **Accesolab** presenta las técnicas de microcalorimetría para el análisis de proteínas y las nuevas aplicaciones del tradicional *Western blot*. Por su parte, **Aspelab** nos trae la plática: FRET: aplicaciones en la biomedicina. Por último, Becton Dickinson (**BD México**) comenta el uso de la Citometría de flujo como una herramienta de análisis.

La idea de esta sección, es brindar al participante un panorama general de las bases y las aplicaciones de estas técnicas para que sirvan de guía en su trabajo, ya sea de enseñanza, de investigación o de difusión.

Dra. Cristina Castañeda Patlán
Junio, 2010

AGRADECIMIENTOS

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

Por la difusión oportuna del Programa en el Taller de Actualización Bioquímica agradecemos al **Dr. Hugo E. Huitrón Vera**, Director de la Gaceta, UNAM, a la **Sra. Martha Marín Zapata**, Jefa del Departamento de Información y Prensa de la Gaceta de la Facultad de Medicina y al personal a su cargo, en particular a la **Lic. Rocío Muciño Ramírez**.

A todo el personal de la imprenta, en especial al **Lic. Francisco Javier Islas Hernández**, Jefe de Departamento de Imprenta.

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

Por último, queremos agradecer a las empresas patrocinadoras: **ACCESOLAB**, **AB SCIEX**, **ASPELAB**, **BD México** y **MILLIPORE**, así como a la **Red Latinoamericana de Biología** y la **Academia Mexicana de Ciencias**, quienes han brindado su apoyo.

XXXVII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 2 al 4 de agosto de 2010

Hora	Lunes 2	Martes 3	Miércoles 4
8:30-9:00	Inauguración		
9:00-10:00	Dra. Erika Patricia Rendón Facultad de Medicina, UNAM <i>Importancia de las uniones estrechas en los epitelios: El papel de las claudinas</i>	Dr. Miguel Costas Facultad de Química, UNAM <i>Estabilidad cinética de proteínas</i>	Dra. Sylvie Le Borgne División de Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM-Cuajimalpa <i>Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitioautótrofas, relevancia ambiental y biotecnología</i>
10:00-11:00	Dr. Gerardo R. Vasta Center of Marine Biotechnology, University of Maryland <i>Aspectos bioquímicos, estructurales y funcionales de las galectinas en la inmunidad</i>	Dr. Antonio Lazcano Facultad de Ciencias, UNAM <i>Origen y evolución de los virus: ¿Genes errantes o parásitos primitivos?</i>	Dr. Gustavo Salinas Facultad de Química/Ciencias, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay <i>Bioquímica de la selenocisteína, el 21^{er} aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana</i>
11:00-11:20	Receso		
11:20-12:20	Dra. Lourdes Muñoz Departamento Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, IPN <i>La genética de poblaciones prehispánicas mexicanas y su importancia</i>	Dr. Javier Sánchez Escuela de Ciencias Biológicas, IPN <i>El papel de la mitocondria en la respuesta inmune</i>	Dr. Lorenzo Segovia Instituto de Biotecnología, UNAM <i>Ingeniería de proteínas y evolución dirigida</i>
12:20-13:20	Dra. Francisca Pérez Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS <i>Radicales libres, estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas</i>	Dra. Brenda Anguiano Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla <i>Funciones extratiroides del yodo</i>	Dr. Daniel Limón Facultad de Ciencias Químicas, BUAP <i>Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos</i>
13:20-15:00	Comida		
15:00-16:00	Dr. Luis Felipe Jiménez Facultad de Ciencias, UNAM <i>Análisis de la expresión genética in situ con el microscopio de fuerza atómica</i>	Dr. Deckar Enrique Rojas AB SCIEX <i>Señalización, fosforilación y caracterización de péptidos y proteínas por espectrometría de masas</i>	M. en C. Enrique Santos Accesolab <i>Análisis de proteínas por western blot</i>
16:00-17:00	Dr. Robert Dunakin Aspelab <i>FRET: Aplicaciones en la biomedicina</i>	Dr. Eduardo Infante BD México <i>Citometría de flujo como una herramienta de análisis</i>	Dr. Deckar Enrique Rojas AB SCIEX <i>"Mass Spectrometry Imaging" (MSI) para análisis moleculares en tejidos: proteínas y lípidos</i>
17:00-18:00	M. en C. Luis Sánchez Accesolab <i>Técnicas de microcalorimetría para el análisis de proteínas</i>		

XXXVII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 2 al 4 de agosto de 2010

LUNES

8:30 Registro e Inscripciones

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

Conferencias:

9:00-10:00

Dra. Erika Patricia Rendón

Facultad de Medicina, UNAM

"Importancia de las uniones estrechas en los epitelios: El papel de las claudinas"

10:00-11:00

Dr. Gerardo R. Vasta

Center of Marine Biotechnology, University of Maryland

"Aspectos bioquímicos, estructurales y funcionales de las galectinas en la inmunidad"

11:20-12:20

Dra. Lourdes Muñoz

Departamento Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, IPN

"La genética de poblaciones prehispánicas mexicanas y su importancia"

12:20-13:20

Dra. Francisca Pérez

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS

"Radicales libres, estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas"

15:00-16:00

Dr. Luis Felipe Jiménez Facultad de Ciencias, UNAM

Facultad de Ciencias, UNAM

"Análisis de la expresión genética in situ con el microscopio de fuerza atómica"

16:00-17:00

Dr. Robert Dunakin

Aspelab

"FRET: Aplicaciones en la biomedicina"

17:00-18:00

M. en C. Luis Sánchez

Accesolab

"Técnicas de microcalorimetría para el análisis de proteínas"

XXXVII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 2 al 4 de agosto de 2010

MARTES

9:00-10:00

Dr. Miguel Costas

Facultad de Química, UNAM

"Estabilidad cinética de proteínas"

10:00-11:00

Dr. Antonio Lazcano

Facultad de Ciencias, UNAM

"Origen y evolución de los virus: ¿Genes errantes o parásitos primitivos?"

11:20-12:20

Dr. Javier Sánchez

Escuela de Ciencias Biológicas, IPN

"El papel de la mitocondria en la respuesta inmune"

12:20-13:20

Dra. Brenda Anguiano

Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla

"Funciones extratiroideas del yodo"

15:00-16:00

Dr. Deckar Enrique Rojas

AB SCIEX

"Señalización, fosforilación y caracterización de péptidos y proteínas por espectrometría de masas"

16:00-17:00

Dr. Eduardo Infante

BD México

"Citometría de flujo como una herramienta de análisis"

XXXVII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 2 al 4 de agosto de 2010

MIÉRCOLES

9:00-10:00

Dra. Sylvie Le Borgne

División de Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM-Cuajimalpa

"Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitotróficas, relevancia ambiental y biotecnología"

10:00-11:00

Dr. Gustavo Salinas

Facultad de Química/Ciencias, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay

"Bioquímica de la selenocisteína, el 21^{er} aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana"

11:20-12:20

Dr. Lorenzo Segovia

Instituto de Biotecnología, UNAM

"Ingeniería de proteínas y evolución dirigida"

12:20-13:20

Dr. Daniel Limón

Facultad de Ciencias Químicas, BUAP

"Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos "

15:00-16:00

M. en C. Enrique Santos

Accesolab

"Análisis de proteínas por western blot"

16:00-17:00

Dr. Deckar Enrique Rojas

AB SCIE X

"Mass Spectrometry Imaging (MSI) para análisis moleculares en tejidos: proteínas y lípidos"

XXXVII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallaes", Facultad de Derecho, UNAM
Del 2 al 4 de agosto de 2010

Comité organizador

Georgina Álvarez Fernández
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
galfer@unam.mx

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

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

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

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

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

Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXXIV, 2010**. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, XV-XXII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

LA INAUGURACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE MÉXICO Y EL NACIMIENTO DEL ESPÍRITU UNIVERSITARIO

Raúl González Lezama

Departamento de Proyectos Históricos
Instituto Nacional de Estudios Históricos de las Revoluciones de México

Al cumplirse el primer centenario del inicio de la Guerra de Independencia, ocurrieron dos acontecimientos de suma relevancia para la historia de México. Uno de ellos trajo el nacimiento de una de las instituciones más importantes y sólidas con que cuenta nuestro país en la actualidad; el otro, por su parte, significó la muerte de toda una era. Nos referimos a la fundación de la Universidad Nacional inaugurada en el mes de septiembre de 1910 y al inicio del movimiento revolucionario que sobrevino dos meses más tarde.

La descomposición política del régimen, así como las crecientes tensiones sociales, explican sin dificultad el derrumbe de Porfirio Díaz, sin embargo, lo que nos resulta más difícil de comprender, es cómo fue posible que a la caída del gobierno porfirista en mayo de 1911, la institución educativa refundada pocos meses antes, hubiera sobrevivido, sobre todo, considerando la oposición y el carácter de las críticas que se formularon públicamente en su contra. Suprimir la Universidad al triunfo de la Revolución, hubiera parecido una medida lógica debida a su identificación con el régimen anterior,¹ medida similar había sido adoptada anteriormente en el siglo XIX. Los sucesivos levantamientos, por su parte, lejos de disipar la tormenta que amagaba a la institución, aportaron una gran cantidad de inconvenientes y peligros que con menor o mayor éxito, fueron conjurados, logrando la Universidad conservar una precaria existencia durante aquellos años turbulentos hasta conquistar la estabilidad y la aceptación de la mayoría.

Ciertos elementos y circunstancias que se vinieron configurando desde años anteriores al 22 de septiembre de 1910, intervinieron para que en primer término la fundación de la Universidad fuera posible y para que lograra sobrevivir al régimen dentro del cual nació. Le permitieron también, ir sorteando la multitud de dificultades que entrañaba una época de inestabilidad política e ir adquiriendo, de manera paulatina, una mayor independencia del Estado, la que sin haberlo declarado de forma abierta, fue siempre la intención de sus fundadores, quienes la dotaron de las herramientas que a la postre le ganarían su autonomía. Justo Sierra desde el inicio de su gestión como Secretario de Instrucción Pública en 1905, comenzó a preparar el camino para concretar su sueño de dotar a México de una universidad moderna, anhelo que se había visto frustrado en 1881, cuando siendo diputado, presentó sin éxito ante el Congreso una iniciativa en ese sentido.

¹ Gloria Villegas, "La Universidad de Justo Sierra y la Revolución" en *Memorias del Primer Encuentro de Historia Sobre la Universidad*, México, Coordinación de Humanidades-UNAM, 1984, p. 76.

Treinta años más tarde, con el acuerdo del presidente Porfirio Díaz, formuló un proyecto para formar la Universidad Nacional, en éste, se pensó en reunir bajo una sola conducción a las escuelas profesionales, y los institutos científicos de investigación, a las que se sumarían la aún no muy antigua pero prestigiada Escuela Preparatoria y la nueva de Altos Estudios, de esta manera, la formación profesional tendría la uniformidad y coherencia de que había adolecido y las labores de investigación serían coordinadas y sus frutos contribuirían a la formación de los alumnos.²

Muy pocos acogieron con beneplácito la propuesta de dotar a México de una universidad. La oposición fue grande, principalmente proveniente de los defensores del positivismo, esquema bajo el cual había sido fundada la Preparatoria Nacional por el médico y filósofo Gabino Barreda y cuyo modelo regía también en las Escuelas Profesionales. Por lo tanto, antes de nacer, la Universidad Nacional fue víctima de severas críticas. Agustín Aragón, desde la influyente "Revista Positiva", enfiló sus baterías en contra del proyecto de Justo Sierra y llamó a la defensa del positivismo comtiano. Horacio Barreda, hijo de don Gabino, también hizo pública su inconformidad y junto con Aragón declaró que la nueva institución significaba un retroceso ya que estaba destinada a ser teológica y metafísica y nunca realmente científica.³ Curiosamente, por su parte, la influyente prensa católica, acusó a la Universidad de ser precisamente todo lo contrario, tachándola de positivista.⁴

No obstante, la Comisión de Instrucción Pública de la Cámara de Diputados, integrada por Manuel Flores, Porfirio Parra, R. Martínez Freg, Juan de la Torre y Lorenzo Sepúlveda presentó su dictamen el 9 de mayo de 1910, que fue aprobado y el 26 de mayo se promulgó la Ley de Constitutiva de la Universidad Nacional.⁵ Quedaba poco tiempo para los preparativos del acto de inauguración que debía formar parte de los festejos del primer centenario de la emancipación política de México.⁶ Para la ceremonia inaugural se quiso contar con la asistencia de los académicos más destacados de su momento a nivel internacional, sin embargo, las personalidades se dieron mucho a desear. Pudiera incluso decirse que la Universidad Nacional de México fue desairada por sus hermanas mayores. Con todo, se contó con la participación de un buen número de testigos de honor, la mayoría de ellos representantes de universidades norteamericanas.⁷

Por su parte, el contingente de académicos mexicanos estaba formado por los directores de las escuelas profesionales que recibirían el doctorado *ex officio* el propio día 22 de septiembre en la ceremonia inaugural: Escuela Nacional Preparatoria: Manuel Flores; Escuela Nacional de Jurisprudencia: Pablo Macedo; Escuela Nacional de Medicina: Eduardo Liceaga; Escuela Nacional de Ingenieros: Luis Salazar; Escuela Nacional de Bellas Artes: Antonio Rivas Mercado; Escuela Nacional de Altos Estudios: Porfirio Parra. A estos se les sumaban 46 profesores de las distintas Escuelas Universitarias quienes junto con sus directores también recibirían el doctorado en reconocimiento a su labor pedagógica.⁸ La selección de los profesores que habían de ser distinguidos con el doctorado *ex officio* no dejó de presentar inconvenientes. Dado que algunas escuelas presentaron un número demasiado crecido de candidatos, la Escuela Nacional de Jurisprudencia quiso dar ejemplo de mesura y su director, de conformidad con Justo Sierra y Ezequiel A. Chávez, determinó no otorgar esta distinción a los profesores que, si bien estaban dotados de gran talento, por su juventud no habían realizado en el mundo académico una aportación significativa y en este caso se encontraban Jorge Vera Estañol y Víctor Manuel Castillo quienes esperaban ser incluidos entre los seleccionados y cuya exclusión les produjo algún

² Archivo Histórico de la Universidad (en los sucesivos AHUNAM), Ezequiel A. Chávez, Vol. 2, Exp. 11, Doc. 1.1, f. 7.

³ Javier Garciadiego, *Rudos contra científicos: La Universidad Nacional durante la Revolución Mexicana*, México, El Colegio de México-UNAM, 1996, pp. 438, p.27.

⁴ "El País", 19 y 21 de mayo de 1910, citado por Garciadiego, *Op. Cit.* p. 27.

⁵ Gloria Villegas, *Op. Cit.*, p. 81-82.

⁶ Borrador del Anteproyecto de Ley Constitutiva de la Universidad Nacional, AHUNAM, Ezequiel A. Chávez, Vol. 1, Exp. 1, f. 1.

⁷ Delegados de las universidades extranjeras que concurrirán a la inauguración de la Universidad Nacional, AHUNAM, Ezequiel A. Chávez, Vol. 6, exp. 35, f. 1.

⁸ AHUNAM, Escuela Nacional de Jurisprudencia, Vol. 7, exp. 4, f. s/n.

malestar.⁹ El pequeño diferendo nos da la oportunidad de conocer la idea que se tenía del papel que debían de interpretar los nuevos doctores de la Universidad Nacional. En la Junta de Profesores en la cual se debía hacer la selección de los agraciados, se definió que características debían de reunir los aspirantes a la distinción:

Un doctor no es simplemente un profesor; un doctor es una individualidad docente que se distingue de sus colegas, que se levanta sobre la mayoría de ellos, que por su inteligencia, que por sus conocimientos, que por sus métodos, es capaz de fundar una escuela, y es ó ha sido un profesor de profesores.

El que haya aquilatado esas cualidades, pude ser nombrado *ex officio*, pero el que no lo haya demostrado de una manera evidente, el que no constituya una personalidad indiscutible desde un alto punto de vista intelectual y científico, aunque su talento sea grande, aunque por él se revele una promesa para lo futuro, no debe aspirar al doctorado *ex officio*; debe conquistarlo con su esfuerzo personal y obtener el grado universitario.¹⁰

Allanados lo principales obstáculos, como estaba previsto y con la solemnidad del caso, el 22 de septiembre de 1910 se inauguró la Universidad. Mientras que para la mayoría de los espectadores, se trataba de una ceremonia más, de las que la Comisión de las fiestas había venido organizando desde 1907, para los nuevos universitarios era un hito en la historia de la educación. El acto, se llevó a cabo en el anfiteatro de la Escuela Nacional Preparatoria — proyectado y construido por el arquitecto Samuel Chávez—, que abrió sus puertas a las nueve y cuarto de la mañana para recibir a los invitados.¹¹

En la galería baja, fueron agrupados bajo los estandartes de sus respectivas escuelas, los diversos profesores que en la ceremonia iban a recibir el grado del doctor *ex officio* de la misma Universidad. Lo mismo hicieron los directores de los Institutos Bacteriológico, Médico, Patológico, Astronómico y Geológico Nacionales, los del Observatorio Meteorológico Nacional, de la Comisión Exploradora de la Fauna y de la Flora Nacionales, y los encargados de la Dirección Agraria y de la Dirección General de Agricultura, que formaban el núcleo representativo de la Escuela Nacional de Altos Estudios, con su Director Porfirio Parra á la cabeza. Se hallaban ubicados también algunos altos funcionarios mexicanos y diversas familias distinguidas.¹² El público en general, así como los profesores y alumnos de las escuelas universitarias; llenaron por completo la sillería de la galería alta. Por su parte, en plataforma especialmente habilitada, fueron acomodados los miembros del cuerpo diplomático acreditado en México, los representantes especiales de las naciones amigas de México, los delegados de las universidades invitadas á la ceremonia y don Joaquín Eguía, que en breve se convertiría en el primer rector de la Universidad Nacional.

A las diez y media de la mañana hizo su arribo el presidente de la República acompañado de los ministros de Relaciones Exteriores, Fomento, Guerra y Comunicaciones, así como los subsecretarios de Hacienda y Crédito Público y de Relaciones Exteriores, siendo recibidos en la puerta de la Escuela Nacional Preparatoria, por el secretario Sierra, acompañado del cuerpo de profesores de dicha escuela. Al ingresar el Primer Magistrado de la Nación al anfiteatro, la orquesta de alumnos de la Escuela Preparatoria ejecutó el Himno Nacional.¹³

Una vez que el primer mandatario tomó asiento en el lugar de honor, don Justo pronunció el discurso inaugural. A lo largo de su alocución, el secretario de Instrucción Pública describió la idea que tenía sobre la naturaleza y misión de la institución que veía la luz ese día, y marcó las

⁹ *Ibidem*.

¹⁰ Libro de Actas de Junta de Profesores. Secretaría 1886. Acta de la Junta de Profesores del 4 de agosto de 1910, AHUNAM, Escuela Nacional de Jurisprudencia, Vol. 64, exp. s/n, fs, 98-99.

¹¹ Universidad Nacional, *La Universidad Nacional de México 1910*, México, Imprenta Universitaria, 1910, p. 101.

¹² *Ibidem*.

¹³ Genaro García, *Crónica oficial de las fiestas del primer centenario de la Independencia de México*, México, p. 203.

grandes diferencias que la separaban de la universidad colonial. Al finalizar la intervención de Justo Sierra, el Señor Presidente de la República, puesto en pie, hizo la siguiente declaración: "Hoy, 22 de septiembre de 1910, declaro inaugurada solemne y legalmente la Universidad Nacional de México"¹⁴ que fue acogida con grandes aplausos, e "inmediatamente después de la cual se descubrieron las cortinas que cubrían el gran tragaluz del anfiteatro, entrando de lleno la luz del día al severo local".¹⁵

Tras la declaración, Ezequiel A. Chávez, subsecretario de Instrucción, dio lectura a la lista de las personalidades que por sus servicios eminentes prestados a la ciencia, la patria o la humanidad habían sido honradas con el doctorado *honoris causa* de la Universidad Nacional de México. De igual forma, dio lectura a los individuos que habían sido merecedores del doctorado *ex officio*, ambas listas fueron ovacionadas por el público presente.

Por su parte, cada uno de los representantes de las universidades extranjeras, invitadas a testificar el acto, hicieron uso de la palabra para dar la bienvenida a su hermana más joven, "siendo particularmente aplaudidos los delegados de las Universidades de París y de California, Señores profesor Ernet Martinenche y Doctor Benjamín Ide Wheeler, que apadrinaron la inauguración".¹⁶

Terminada esta serie de alocuciones, Justo Sierra vitoreó en latín a la Universidad, al presidente de la República y a la patria mexicana.¹⁷ Se organizó la Procesión Universitaria, que los diarios de la época describieron como "brillante", aún cuando sólo recorrió tres calles que separaban el nuevo anfiteatro de la Preparatoria al antiguo edificio de la Escuela Normal de Maestros, en donde se habían instalado las oficinas de la Universidad Nacional, se encontraba cargada de simbolismo. Le tocó también ser la primera de todas las realizadas durante las fiestas del Centenario, que el Presidente de la República y los miembros de su gabinete recorrían a pie. Encabezaban la comitiva los directores de las escuelas universitarias portando las banderas de sus instituciones; los seguían los miembros del Consejo Universitario, los doctores de las universidades extranjeras, los nuevos doctores *ex officio* mexicanos, el señor presidente y sus ministros y al final los miembros del Estado Mayor presidencial. Todos ellos bordeados por militares y acompañados por las notas del Himno Nacional. Desde los balcones, las familias arrojaban flores a su paso.

A su llegada a la sede universitaria, la comitiva ascendió por una magnífica escalera y se instaló en el Salón de Sesiones del Consejo Universitario que había sido proyectado y dirigido por Leopoldo Batres con una espléndida decoración. Ahí el presidente de la República tomó la protesta de ley como primer rector a Joaquín Eguía Lis¹⁸ quien conmovido protestó cumplir la Constitución de 57. Conducidos por el ministro Sierra los nuevos doctores y los delegados extranjeros fueron presentados a Don Porfirio quien tuvo frases elogiosas para cada uno de ellos. Terminado el "besa manos" un *lunch* fue servido en un gran salón, donde hizo uso de la palabra el señor Presidente de la República, el señor embajador Guild y el señor Wom Bodwin. A la una y media de la tarde el primer mandatario se retiró y los invitados de honor abordaron un tren especial a San Ángel Inn donde la Secretaría de Instrucción Pública les ofreció un banquete a los delegados de las universidades extranjeras y a los superintendentes de las escuelas norteamericanas. Banquete que

¹⁴ *Ibidem*, p. 204.

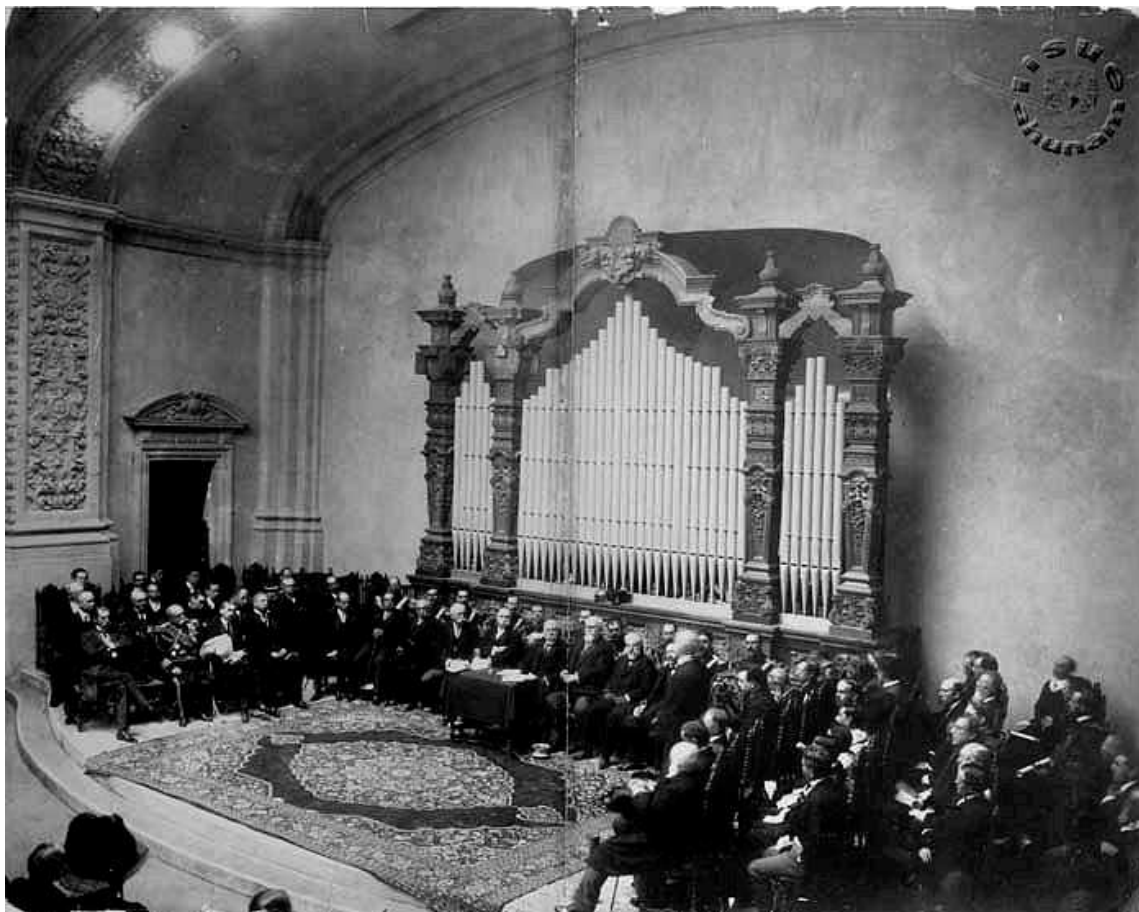
¹⁵ *La Universidad Nacional de México 1910*, p. 103.

¹⁶ *Ibidem*.

¹⁷ Genaro García, *Op. Cit.*, p. 205.

¹⁸ Nacido en 1833 Don Joaquín había prestado sus servicios al Estado desde tiempos del Segundo Imperio donde ascendió rápidamente desde secretario del juzgado de primera instancia de Cuautitlán, a juez supernumerario del Tribunal Supremo del Departamento del Valle de México, siendo además, director del Liceo, Colegio y Escuela Especial de Derecho, al triunfo de la República continuó desempeñándose como docente en la Escuela Nacional de Jurisprudencia impartiendo durante muchos años la cátedra de Derecho Romano y dirigiendo el Registro Público de la Propiedad. Raúl A. González Lezama y Adriana Jiménez Mora, *Directorio Biográfico de la Administración Pública del Segundo Imperio*, inédito.

según crónica de "El Imparcial" resultó muy cordial por el entusiasmo no interrumpido de los asistentes.¹⁹



Solemne ceremonia de Inauguración de la Universidad Nacional de México presidida por el presidente de la república, General Porfirio Díaz. Anfiteatro "Simón Bolívar" de la Escuela Nacional Preparatoria, 22 de septiembre de 1910. AHUNAM.

Volvamos a la ceremonia de fundación, ya que en ella, encontramos varios elementos que merecen ser analizados pues nos dan cuenta de la idea que sobre la nueva institución habían forjado sus precursores. El desfile de togados con que fue inaugurada la Universidad en 1910 tenía una significado muy distinta a las muchas otras marchas por las calles que ese año de centenario se habían visto pasar por la Ciudad de México, no era para adornar con vistosos trajes la ceremonia, su importancia era mucho mayor, simbólicamente la hermanaba a todas las universidades y recordaba el espíritu con el que fueron inaugurados los cursos de la antigua Universidad de México en el siglo XVI y que deliberadamente fue recreado en el XX.

El sábado 3 de junio de 1553 en las calles de México se formó un cortejo, al frente del cual abría camino un bedel empuñando una brillante maza de plata. Tras él seguían los docentes destinados a constituir el claustro de maestros y doctores; luego el cabildo de la catedral metropolitana y los alcaldes y regidores de la ciudad; a continuación los oidores de la Real

¹⁹ "El Imparcial" viernes 23 de septiembre de 1910, p, 15.

Audiencia y, por último, cerrando la procesión don Luis de Velasco virrey de la Nueva España.²⁰ En el General de Actos fue montada una plataforma para el virrey y el resto de los miembros de la Audiencia. Los miembros de los cabildos de la ciudad y el eclesiástico tomaron asiento junto al Claustro Universitario. El rector Antonio Rodríguez de Quezada, miembro también de la Audiencia en calidad de oidor, solicitó permiso al virrey para dar principio a la ceremonia. Se puso en pie Francisco Cervantes de Salazar que de la Universidad de Osuna vino a la Nueva España para dictar la cátedra de retórica precedido de una trayectoria dentro de la que se contaba haber secretario de fray García de Loaysa, general de la Orden de Santo Domingo.²¹ En aquella solemne ocasión, dirigiéndose a los asistentes en latín, destacó la relevancia que significaba que en adelante la Nueva España nunca más enviaría a sus hijos “ávidos de ciencia y de saber” a universidades europeas.²²

De igual modo que siglos atrás, los doctores de las universidades extranjeras, invitadas a la ceremonia, no sólo testificaron el nacimiento de la moderna Universidad de México, en procesión de reminiscencia medieval, daban la bienvenida a sus colegas al muy noble y antiguo gremio de los maestros y discípulos de las primeras universidades, que en su momento, lucharon para conservar su autonomía y el derecho a impartir una enseñanza mucho más amplia que la brindada por las instituciones eclesiásticas.

No desaparecieron las críticas con la inauguración de la Universidad, quince días antes de estallar la Revolución, Aragón afirmaba que la Universidad no era ni universidad de Estado ni libre, era un híbrido que sólo produciría una nueva casta, la “pedantocracia”.²³

En las postrimerías del régimen de Díaz se intentó salvar la situación mediante modificaciones en la composición del gabinete presidencial, para la Universidad significó el inicio de una larga serie de movimientos de autoridades y modificaciones en las políticas educativas. El primer cambio ocurrió en marzo de 1911 cuando Justo Sierra fue remplazado por Jorge Vera Estañol en la Secretaría de Instrucción, el puesto de subsecretario desempeñado hasta entonces por Ezequiel A. Chávez fue ocupado por Julio García.

Al triunfo de la Revolución y tras la elección de Francisco I. Madero, sin la presencia del general Díaz para defenderla, se intentó desaparecer a la Universidad, pero ahora desde el propio Congreso, mediante el “mezquino recurso de suprimir la institución en forma indirecta, borrándola del presupuesto”.²⁴ También tras de los hechos conocidos como la Decena Trágica, la Universidad fue víctima de las simpatías y las fobias de las distintas facciones que sucesivamente dominaron la escena política. Se intentó militarizarla, la Preparatoria le fue segregada y anexada, clausurada y abierta y su existencia siempre se encontró amenazada. Sin embargo, logró sobrevivir al caos revolucionario y pocos años después conquistó su autonomía. El elemento que evitó su desaparición había sido sembrado por sus fundadores y éste le confirió la fuerza necesaria para sobrevivir. No fue gratuito que el artículo 1º de su Ley Constitutiva hubiera definido a la Universidad como un “cuerpo docente” entendido éste como la unión de hombres dedicados al estudio y difusión del conocimiento, pero sobre todo para su protección en contra de la imposición y la censura. Resulta entonces más claro que hubieran nombrado tantos doctores *ex officio* y *honoris causa*, no sólo para halago de los agraciados, fue también una invitación a los hombres de mérito a sumarse al gremio de los educadores a fin de legitimarlo y defenderlo si fuera el caso. Así interpretaba Ezequiel A. Chávez la intención de Sierra:

²⁰ Alberto María Carreño, *La Real y Pontificia Universidad de México. 1836-1865*, UNAM, 1961, México, 502 pp. P. 41-42.

²¹ *Ibidem* p. 42.

²² Alberto María Carreño, *La Real y Pontificia Universidad de México. 1836-1865*, UNAM, 1961, México, 502 pp, p. 42.

²³ Villegas, *Op. Cit.*, p. 88-89.

²⁴ Informe sobre la Marcha General de las Escuelas Universitarias del Rector Joaquín Eguía, 1913, AHUNAM, Ezequiel A. Chávez, Vol. 3, exp. 21.

En sus ansiosas excursiones al pasado el preclaro fundador de la Universidad Nacional había visto, por otra parte, que las primeras Universidades, aquellos gremios de maestros y de discípulos, que defendían áspera y valientemente su derecho a vivir, habían venido a la vida, para forjar e impartir enseñanzas de mayor alcance que las que ofrecían entonces las escuelas de los monasterios y de las catedrales; y él, en consecuencia, por modo idéntico, quiso que la nueva Universidad viniera entre nosotros no sólo a formar un fuerte gremio de maestros y de estudiantes, que defendiera bravamente su derecho a vivir con autonomía plena, sino a investigar también, en la nueva escuela de Altos Estudios, y en los institutos de investigación científica con ella coordinados, verdades no conocidas, a enseñar también verdades no enseñadas.²⁵

Afirma Garciadiego que al momento de su fundación la Universidad no era más que una pequeña oficina, encabezada por un rector, que escasamente administraba un grupo reducido de escuelas ya existentes.²⁶ Justo Sierra pensaba de manera distinta, esto es, una universidad no es tal por el número o tamaño de sus instalaciones, lo numeroso o escaso de su alumnado, lo es por la calidad y misión de sus integrantes, comprendiendo entre ellos a los alumnos, los cuales no podían ser considerados sujetos pasivos, por el contrario, debían de tener un papel activo en las decisiones formando parte del Consejo Universitario. Sobre este punto, el secretario Sierra tuvo muchas dificultades para hacerse comprender. Poco antes de presentar el proyecto de ley de la universidad, solicitó la opinión de José Yves Limantour, secretario de Hacienda quien expresó su rechazo categórico:

Mi opinión es enteramente contraria a que formen parte del Consejo Universitario los alumnos de las escuelas. No creo que exista cosa semejante en ninguna Universidad del mundo. Admitir que los alumnos discutan planes de estudio, programas y métodos de enseñanza y voten sobre esas cuestiones, es simplemente subversivo; y si con esa disposición se cree encauzar el espíritu crítico y la turbulencia de la juventud, se comete un error trascendental, pues lejos de obtener aquel resultado, crecerán las pretensiones de los estudiantes.²⁷

No le extrañó a don Justo la oposición del ministro de Hacienda a la inclusión de los alumnos dentro del Consejo. Nadie apoyó ese punto contenido en el artículo 7 del proyecto de iniciativa, ni los miembros de la Comisión de la Cámara de Diputados, ni ninguno de los ministros, e incluso, el propio Díaz dudó mucho pero terminó por aceptarlo.

Para Sierra no sólo parecía natural, sino necesaria la participación y opinión de todos los elementos que conformaban la Universidad:

"¿Por qué ha de ser subversivo dar a un elemento esencial de la vida universitaria una voz en el Consejo, como antaño, como cuando nacieron las universidades formando verdaderas repúblicas democráticas dentro del Estado, en la época en que eran gremios de maestros y profesores?"²⁸

La tarea primordial de la Universidad en sus primeros momentos fue la búsqueda de la unidad y fortaleza de ese cuerpo docente, entendidas estas tanto como la creación de vínculos de cohesión entre sus distintos componentes, incluyendo académicos, investigadores, trabajadores y alumnos; así como la conformación de una comunidad estrechamente ligada, capaz de lograr un eficiente intercambio académico que evitara la pérdida de los valiosos frutos de las investigaciones

²⁵ Discurso pronunciado por el Lic. Ezequiel A. Chávez, Dr. H. C. en el salón de sesiones del Consejo Universitario, el 13 de septiembre de 1913, en el acto en que se descubrió el busto del fundador de la Universidad Nacional Don Justo Sierra., AHUNAM, Ezequiel A. Chávez, Vol. 3. Exp. 24, f. 42.

²⁶ Javier Garciadiego, *Op. Cit.*, p. 104.

²⁷ José Yves Limantour a Justo Sierra, 22 de abril de 1910, en *Justo Sierra, Obras Completas t. XIV: Epistolario y papeles privados*, México, UNAM, 19178, p. 398.

²⁸ Justo Sierra a José Yves Limantour, 25 de abril de 1910, en *Justo Sierra, Op. Cit.*, p. 408.

realizadas en sus escuelas e institutos científicos. Pero también para la defensa de los altos valores universitarios. En ese sentido, el éxito fue casi inmediato, tanto que en 1913 el propio rector Eguía y Lis, lejos de condenar el movimiento separatista de alumnos y maestros de la Escuela de Jurisprudencia que dio como resultado la creación de la Escuela Libre de Derecho, lo alabó y puso como ejemplo diciendo:

"Y ya que menciono la Escuela Libre, permitidme que, como el año pasado, declare que la Universidad debe ver en ella un motivo de estímulo y de ejemplo: una institución docente que se organiza, fuera de las imposiciones del Estado, y que vive y cumple sus fines con independencia y eficacia."²⁹

Hoy en día al igual que en el momento de su concepción, la Universidad Nacional Autónoma de México continúa siendo centro de polémicas. Se discute principalmente sobre su carácter de institución pública y sobre los recursos que ésta recibe. Buena parte de sus críticos actuales, basan sus reflexiones en argumentos ya esgrimidos y derrotados cien años atrás. Tampoco resulta nueva la estrategia de acallar o destruir a la Universidad mediante el estrangulamiento de su presupuesto. Todo lo anterior demuestra la enorme necesidad de que estos hechos pasados se estudien con mayor profundidad y los resultados de estas investigaciones sean difundidos para demostrar que el título de Nuestra Máxima Casa de Estudios —con la que es conocida incluso por sus detractores—, fue conquistado porque su carácter de Universidad se lo ha dado la unión de los mejores y comprometidos alumnos, maestros, investigadores y trabajadores, que reconocen que el derecho a enseñar, aprender y trabajar conforme a su conciencia es el cimiento de un pueblo libre.

Otras referencias

María y Campos, Alfonso (1975). *Estudio histórico-jurídico de la Universidad Nacional (1881-1929)*, México, UNAM.

Garciadiego Dantán, Javier (1994). "El proyecto universitario de Justo Sierra: circunstancias y limitaciones", en *Tradición y reforma en la Universidad de México*, CESU-UNAM/Miguel Ángel Porrúa, México, 161-202.

Carrancá, Raúl (1969). *La universidad mexicana*, Fondo de Cultura Económica, México.

Silva Herzog, Jesús (1979). *Una historia de la Universidad de México*, México, Siglo XXI.

Dumás, Claude (1986). *Justo Sierra y el México de su tiempo*, 2 Vols., UNAM, México.

Sierra, Justo (1984). "La Universidad Nacional (proyecto de creación)", en *Obras Completas*, t. VIII, México, UNAM, p.65.

Sierra, Justo (1984b). "Discurso en el acto de la inauguración de la Universidad Nacional de México, el 22 de septiembre de 1910", en *Obras Completas*, vol. V, México, Universidad Nacional Autónoma de México, p. 461 (Nueva Biblioteca Mexicana).

²⁹ Informe sobre la Marcha General de las Escuelas Universitarias del Rector Joaquín Eguía, 1913, AHUNAM, Ezequiel A. Chávez, Vol. 3, Exp. 21.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 1-15. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

IMPORTANCIA DE LAS UNIONES ESTRECHAS EN LOS EPITELIOS: EL PAPEL DE LAS CLAUDINAS

Verónica E. Zavala Zendejas y Erika P. Rendón Huerta
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM,
Ciudad Universitaria, CP 04510, México D.F., México
erendon@bq.unam.mx

Resumen

Las uniones estrechas (UE), localizadas en la región más apical de las células endoteliales y epiteliales, regulan la difusión paracelular de iones y moléculas. La función de las UE se ve comprometida debido a cambios en la expresión y/o localización de las claudinas, proteínas transmembranales cuya función principal es regular la permeabilidad paracelular y mantener la polaridad celular. Las UE tienen un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad célula-célula, por lo que las alteraciones en las claudinas influyen en la pérdida de cohesión entre las células y puede favorecer los procesos de invasión y metástasis en las células cancerosas. El presente trabajo describe las características estructurales y funcionales de las UE, los mecanismos que la regulan y la participación de las claudinas en procesos como el cáncer.

Palabras clave: Uniones estrechas, claudinas, progresión tumoral, cáncer.

Abstract

At the most apical region between epithelial and endothelial cell, tight junctions (TJ) are well known as functioning as a control for the paracellular diffusion of ions and certain molecules. Loss of normal TJ function is an important step for cancer progression, since epithelial compartmentalization is compromised and tissue microenvironment is modified. Tight junctions have a vital role in maintaining cell-to-cell integrity and that the loss of cohesion of the structure can lead to invasion and thus metastasis of cancer cells. Here we view the structural and functional properties of tight junctions and the role of claudins in cancer.

Keywords: Tight junctions, claudins, tumor progression, cancer.

Introducción

En los organismos superiores, la separación de compartimientos funcionales es esencial. Esta separación está confinada a los epitelios y endotelios, cuyas propiedades están definidas de acuerdo a las demandas de cada organismo [1]. Las células epiteliales y endoteliales forman barreras para separar a los órganos en subcompartimientos funcionales regulando el movimiento de agua, iones y proteínas a través de las monocapas manteniendo la polaridad y función de las estructuras celulares [2]. Esta compartimentalización y su aislamiento del medio ambiente externo, es crucial para la función de los sistemas y órganos [3] evitando, por un lado, la difusión descontrolada y el movimiento de sustancias y por otro, controlando de manera selectiva los procesos de transporte vía secreción (dada por glándulas endócrinas y exócrinas), absorción (en el caso del intestino) o reabsorción (en el caso del riñón). Tales procesos de transporte son realizados por la *vía transcelular*, la cual involucra la reabsorción de moléculas a través de la membrana apical, su paso por el citoplasma y su salida por la membrana basolateral (Figura 1). El transporte transcelular se lleva a cabo gracias a la presencia de una serie de transportadores y canales específicos para cada tipo celular, localizados en las membranas apicales y basolaterales de las células. Es un proceso que depende de energía y que permite al organismo reabsorber sustancias esenciales, aun en contra de gradientes electroquímicos y cuya regulación depende de las demandas del organismo.

El movimiento de iones y pequeñas moléculas no cargadas a través del espacio intercelular de células adyacentes se conoce como la *vía paracelular* (Figura 1). Este transporte es pasivo, depende de un gradiente electroquímico y es el resultado de la difusión, electrodifusión u ósmosis de moléculas a través de gradientes creados por los mecanismos transcelulares permitiendo una reabsorción con un consumo mínimo de energía. De esta manera, estos dos tipos de transporte permiten que los epitelios funcionen como barreras permeables, capaces de crear gradientes eléctricos y de concentración de moléculas entre los fluidos lumbales y serosos [4,5].

La ruta paracelular no muestra discriminación en cuanto a la dirección del transporte, sin embargo, muestra pequeñas diferencias en cuanto a la selectividad iónica y cambia enormemente en términos de la resistencia eléctrica entre epitelios [6].

El complejo de unión celular de los epitelios polarizados es una estructura altamente desarrollada formada por varios complejos proteicos bien definidos, entre los que se encuentran las uniones comunicantes (UC), los desmosomas, las uniones adherentes (UA) y las uniones

estrechas (UE) (Figura 2) [7]. La función de barrera en los epitelios, mediante la cual se protegen de antígenos y productos bacteriales presentes en la región luminal, esta regulada por el complejo de unión intercelular apical referido como AJC (por sus siglas en inglés **A**pical **J**unctional **C**omplex). Los principales constituyentes de este complejo son las UE y las UA subyacentes [8] (Figura 2).

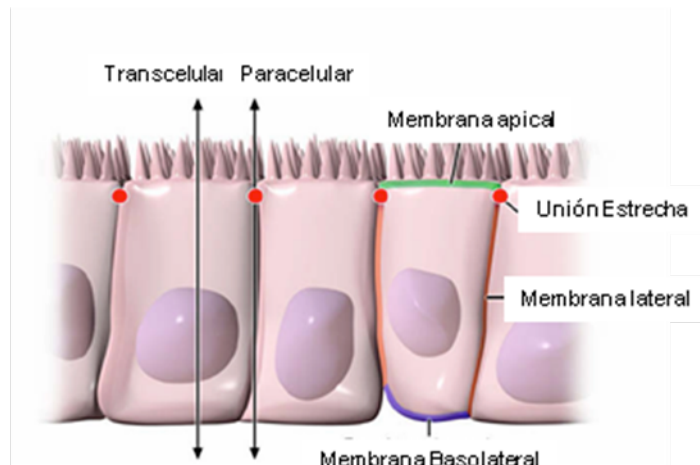


Figura 1. Vías de Permeabilidad Celular. La permeabilidad transcelular está asociada con el movimiento de solutos y agua a través de las células epiteliales. La permeabilidad paracelular está asociada con el movimiento en el espacio intercelular y está regulado por las UE localizadas en la región apico-lateral de las membranas. (Tomado de [48]).

Las UC median la comunicación entre las células permitiendo el paso de iones y pequeñas moléculas de hasta 1000 Da de citoplasma a citoplasma de células vecinas, dando lugar al acoplamiento metabólico y eléctrico entre ellas [9]. Las UA y los desmosomas son los responsables de proporcionar la adhesión mecánica a las células. Los desmosomas son sitios de anclaje para filamentos intermedios y puntos de contacto que fijan a células adyacentes por medio de sus membranas laterales y a las células con la matriz extracelular por medio de sus membranas basales. Las UA forman un “cinturón de adhesión continuo” que sirve para mantener juntas a las células vecinas a través de una familia de moléculas de adhesión dependientes de Ca^{2+} , las caderinas, que se unen a filamentos de actina y de miosina. Las UE son el componente más apical del complejo de uniones intercelulares en células epiteliales de mamíferos. Funciona como una barrera que separa a los dominios apicales y basolaterales y tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis y la polaridad en los tejidos [10].

Función de las UE

Las UE rodean la región apical de la superficie lateral de células epiteliales adyacentes, creando un sellado paracelular continuo entre los compartimentos apical y basolateral. Cuando se visualizan por medio de microscopía electrónica de secciones ultra finas, las UE aparecen como una serie de sitios de fusión de la membrana plasmática de células adyacentes, mientras que por criofractura, aparecen como una red de fibras de partículas de membrana que rodean la región apical de la superficie lateral de cada célula [6,11,12].

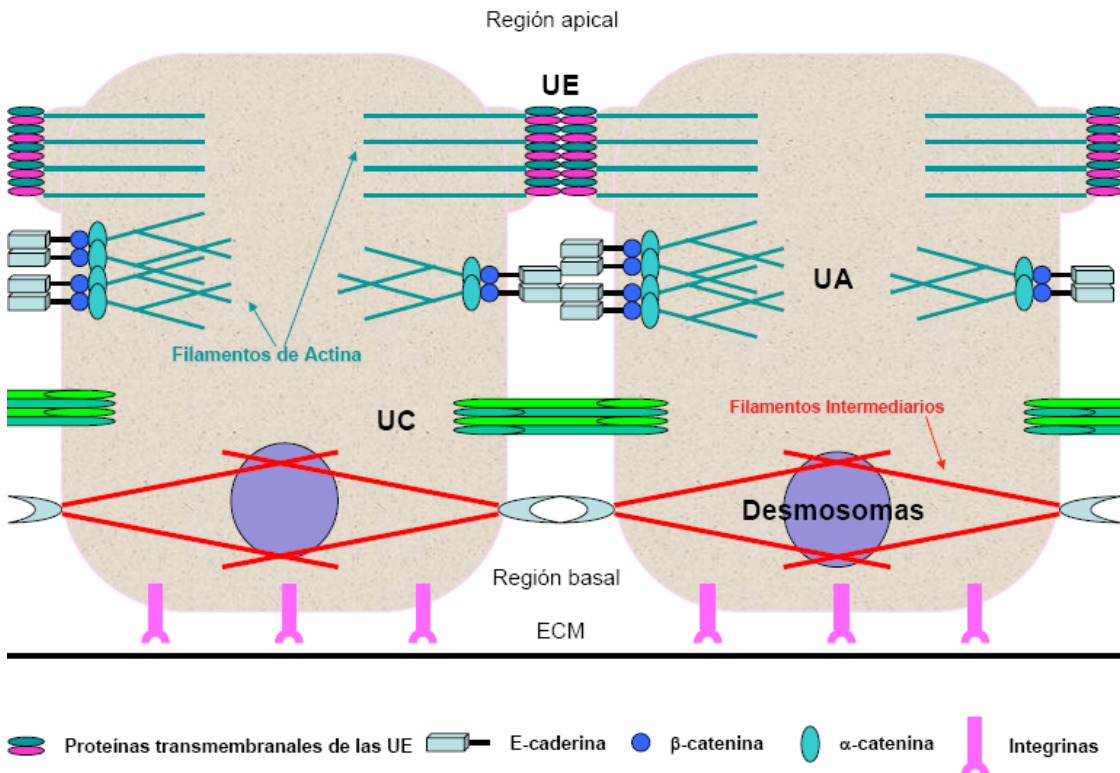


Figura 2. Estructura del complejo de unión celular. Las uniones célula-célula están formadas por desmosomas, las uniones comunicantes (UC), las uniones adherentes (UA) y las uniones estrechas (UE), las cuales crean sellos en la región más apical de la membrana lateral de las células. Figura modificada de [7].

La adhesión celular entre las células adyacentes y la matriz extracelular es clave para la organización del epitelio en los tejidos y es vital para la regulación de los procesos celulares tales como la diferenciación, la expresión génica, la motilidad y el crecimiento [13]. La regulación de estos procesos se lleva a cabo por una parte, mediante complejos multimoleculares conformados por moléculas de adhesión celular, receptores transmembranales y proteínas de citoesqueleto, y por otra, por la activación de vías de señalamiento. Las principales funciones atribuidas a las UE son:

1) Las UE sellan los espacios intercelulares y son las responsables de la separación de los compartimientos apical y basolateral de epitelios y endotelios. Las UE funcionan como barreras de difusión de moléculas hidrosolubles entre células adyacentes y mantienen la polaridad celular, impidiendo la difusión de proteínas y lípidos entre los dominios apicales y basolaterales de la membrana plasmática lo que genera diferentes microambientes en la membrana apical y basal de las células [14,15].

2) Las UE limitan el flujo de solutos a lo largo de la vía paracelular, la cual es más permeable que la vía transcelular. Las UE entonces, son la etapa limitante de la velocidad en el transporte transepitelial y son las determinantes principales de la permeabilidad en la mucosa [16]. Las UE poseen propiedades de barrera mediante las cuales definen el tamaño y la carga de los iones y moléculas que pasarán a través de la vía paracelular. Estas propiedades son reguladas, individual o conjuntamente, por estímulos fisiológicos o patofisiológicos. De acuerdo a lo anterior, las UE son cruciales en la generación de gradientes electroquímicos a través de las monocapas celulares los cuales son necesarios para procesos de transporte vectorial tales como la absorción y la secreción.

- 3) Las moléculas de las UE actúan como intermediarios y transductores en los mecanismos de señalización celular, jugando un papel importante en los procesos de polaridad, diferenciación celular, crecimiento celular y proliferación.
- 4) Las UE actúan como moléculas de adhesión célula-célula.
- 5) Las UE funcionan como una barrera para la migración celular.
- 6) Se sugiere que las UE tienen un papel importante en la inhibición del fenotipo maligno de células en proceso de tumorigénesis.

Aun cuando las propiedades de barrera y de selectividad de las UE son cruciales, se han incrementado las evidencias que muestran que las UE tienen un papel importante en procesos como la proliferación, diferenciación y el desarrollo del cáncer [17].

Estructura molecular de las UE

Las UE tienen una organización supramolecular conformada por más de 40 diferentes proteínas entre las que se encuentran: 1) proteínas citosólicas; que pueden servir como proteínas estructurales o de anclaje, como las *zonula occludens-1* (ZO-1), ZO-2, ZO-3, cingulina, proteína-1 con múltiples dominios PDZ (MUPP1); 2) proteínas de regulación del tráfico vesicular, involucradas en la señalización y la polaridad celular e incluso en la regulación de la expresión génica; y 3) proteínas transmembranales, como las claudinas, ocludina, tricelulina y las moléculas de adhesión (*Junctional Adhesion Molecule*, JAM). Estas proteínas interactúan con proteínas pertenecientes a su misma familia presentes en la membrana de la célula adyacente formando canales paracelulares capaces de regular el paso de moléculas de acuerdo a su tamaño y carga [2,12,18,19] (Figura 3).

Claudinas

A la fecha se han identificado 24 diferentes claudinas en eucariontes (Cldn-1 a -24). Se considera que estas proteínas son los principales componentes de las UE. Las claudinas se expresan de manera ubíqua en las UE de epitelios y endotelios. Aunque su estructura cristalográfica no ha sido obtenida, hay evidencias que sugieren que estas proteínas cruzan cuatro veces la membrana y que sus extremos carboxilo y amino terminal están localizados en el citosol (Figura 4). Su peso molecular varía de 20 a 34 kDa aunque el tamaño promedio se encuentra entre los 22 a 24 kDa. Una claudina típica contiene una secuencia amino terminal de aproximadamente 4 a 5 residuos seguida de una asa extracelular (EL1) de 60 residuos, una asa intracelular de 20 residuos, otra asa extracelular de aproximadamente 24 residuos (EL2) y un dominio carboxilo terminal. El tamaño de este dominio es más variable en longitud (entre 21 y 63 residuos de aminoácidos) [1,22].

Las secuencias de aminoácidos de la primera y cuarta región transmembranal están altamente conservadas entre las diferentes claudinas; las secuencias de la segunda y tercera son más diversas. La primera asa contiene algunos aminoácidos cargados lo que hace pensar en su importancia para la selectividad de cargas en el flujo paracelular. Esta asa contiene también dos residuos de cisteína altamente conservados lo que sugiere que incrementa la estabilidad de la proteína por la formación de un enlace disulfuro intramolecular. Esta asa es importante como correceptor viral (como en el caso de la claudina 1 y el Virus de Hepatitis C) [23]. Se ha sugerido que la segunda asa extracelular, por tener una conformación hélice-vuelta-hélice, puede formar dímeros con claudinas de membranas celulares adyacentes a través de interacciones hidrofóbicas entre residuos aromáticos conservados [24] y sirve como receptor de toxinas bacterianas (como la enterotoxina de *Clostridium perfringens* para las claudinas 3 y 4)

[15]. (Figura 4). Las asas extracelulares son, por tanto el factor limitante para el paso de solutos a través de las capas epiteliales, las cuales dependen en gran medida de la secuencia de aminoácidos y su estructura tridimensional. La discriminación entre cationes y aniones está regulado de acuerdo al total de cargas prevalentes [25]. Con estas características, las claudinas no solamente proveen un espacio paracelular “abierto” o “cerrado” para un soluto determinado, sino que determinan el grado de la barrera epitelial. Algunos reportes han demostrado que la resistencia transepitelial está influenciada por la composición de los subtipos de claudinas.

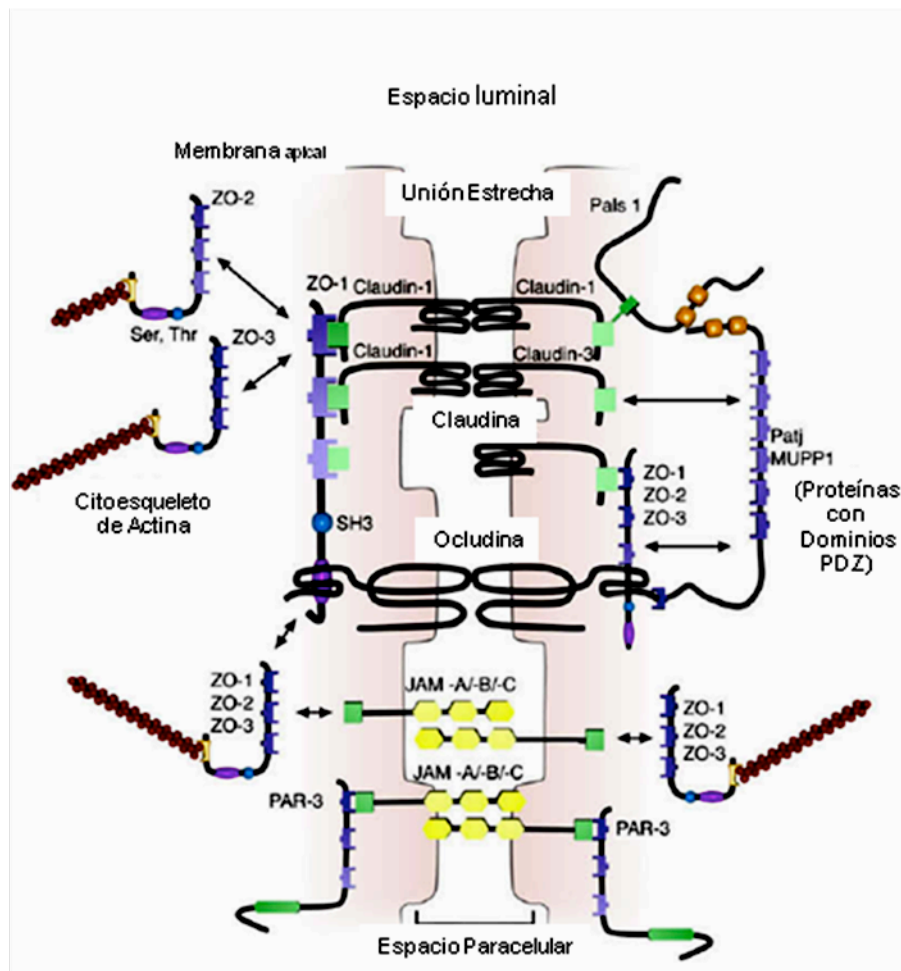


Figura 3. Las proteínas transmembranales (occludinas, claudinas y JAM) de las UE interactúan en el espacio paracelular con proteínas de las células adyacentes. Los dominios intracelulares de las proteínas transmembranales interactúan con dominios PDZ de proteínas adaptadoras que ligan mecánicamente al complejo de UE con el citoesqueleto.

Se sabe poco acerca de la función de sus regiones amino (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal), las cuales se encuentran expuestas al citosol, siendo el C-terminal el que determina, en gran medida, la localización de las claudinas en la membrana. La región C-terminal se encuentra ampliamente conservada en los integrantes de esta familia y contiene sitios de unión a PDZ, con los cuales pueden interactuar con otras proteínas de las UE que contienen dominios PDZ, como las ZO, proteína de las uniones estrechas asociada a PALS-1, una proteína de anclaje, (PATJ) y MUPP1, involucradas en procesos de señalización [18]. La región C-terminal de las claudinas puede ser fosforilada en residuos de serina y/o treonina, regulando su interacción con otras proteínas, su localización y su vida media. Los cambios en la

fosforilación de las claudinas se han asociado con cambios en la permeabilidad paracelular y resistencia transepitelial de las células (medidas empleadas para evaluar la función de las UE) [2,10,18].

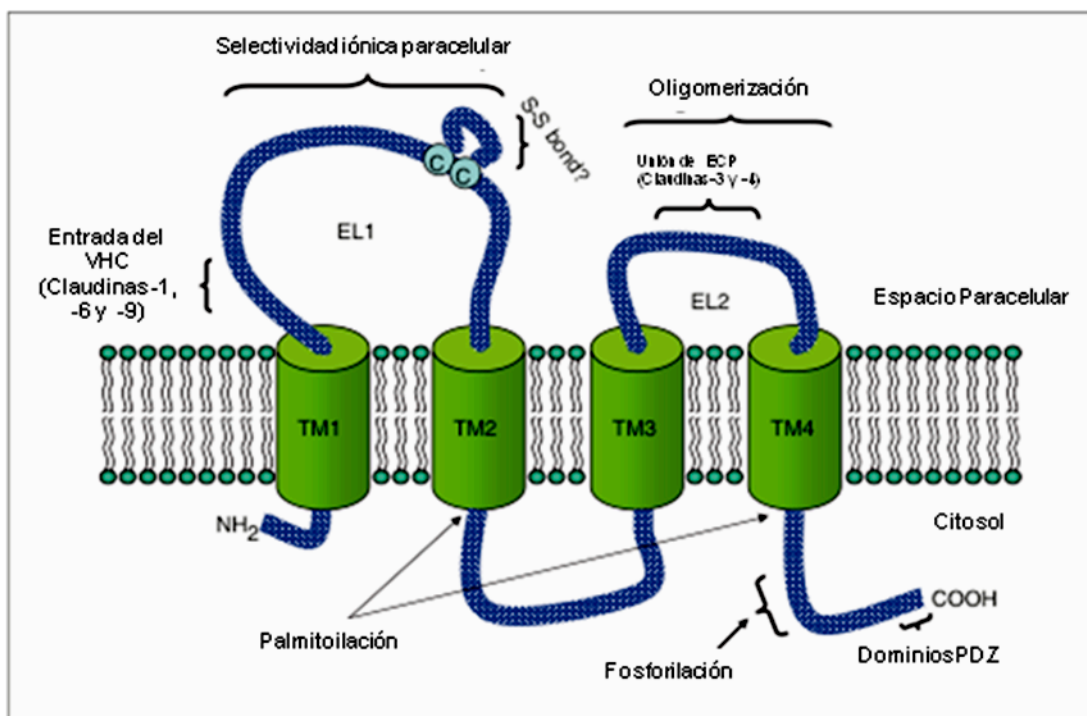


Figura 4. Representación de un monómero de claudina. El modelo predice las características estructurales y algunas de las modificaciones e interacciones conocidas. EL1 y EL2 se refieren a las asas extracelulares 1 y 2 respectivamente. Se muestran los dominios transmembranales 1 al 4 (TM1 al TM4), así como las regiones importantes para la entrada del virus de la Hepatitis C (HCV) y para la unión de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) (Tomado de [22]).

Interacciones claudina-claudina

Los epitelios y endotelios expresan múltiples isoformas de claudinas en una manera tejida específica, sugiriendo la variedad de isoformas de claudinas que pueden entremezclarse en las cadenas de las UE. Las interacciones entre diferentes clases de claudinas tienen el potencial para controlar la permeabilidad de barrera a través de la formación de UE compuestas de múltiples claudinas. Las claudinas interactúan en dos diferentes maneras: 1) lateralmente en el plano de la membrana (interacciones heteroméricas) y 2) por la unión de "cabeza" con "cabeza" entre células adyacentes (interacciones heterotípicas). Con la ayuda de técnicas bioquímicas se han observado homomultímeros de claudinas compuestos de hasta seis monómeros [21,26,27]. La única claudina que puede tener interacciones heterotípicas es la claudina-3, lo que sugiere que este tipo de interacciones son raras y que las interacciones homotípicas pueden ser más comunes. Sin embargo, se requieren de más estudios para determinar esto con certeza.

Interacciones de claudinas con proteínas de anclaje

Se sabe que las interacciones entre claudinas y las proteínas ZO son indispensables para el ensamble de las UE [28]. Se sugiere que ZO-1 y ZO-2 interactúan con las claudinas por un lado, y con el citoesqueleto por el otro, lo cual es esencial para la formación de las UE. Muchas claudinas tienen un dominio YV conservado en la región carboxilo terminal con el que interactúan con las proteínas ZO-1, -2 y -3. Esto fue demostrado para las claudinas de la -1 a la -8 [29]. Las claudinas -1, -5 y -8 pueden unirse a PATJ y MUPP1. Las claudinas pueden interactuar con proteínas de anclaje mediante otros motivos en la región carboxilo terminal [30].

Regulación de la expresión y localización de las claudinas

La actividad de las UE se regula por varias vías de señalización (Cuadro 1). Debido a que las claudinas interactúan con una serie de proteínas de anclaje y de señalización citosólicas, la alteración de alguna de estas proteínas puede afectar a la localización, función y expresión de las claudinas, tanto a nivel genético como proteico.

La polimerización de las claudinas en las membranas laterales y su localización en la región más apical de los complejos de unión intercelular en vertebrados se encuentra regulada por las proteínas ZO-1 y ZO-2. El reclutamiento a la membrana plasmática y la dimerización de dichas ZO es indispensable para iniciar la polimerización de las claudinas e incluirlas en las UE [31,32]. Sin embargo, en algunos tipos celulares se ha encontrado que las claudinas se distribuyen también en otras regiones de la membrana lateral sin formar cadenas de UE [33], por lo que debe haber otros mecanismos que regulen su localización.

Dentro de las modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las claudinas se encuentran la fosforilación y la palmitoilación. Ambas afectan la localización de estas proteínas en la membrana plasmática, dando lugar a cambios en la permeabilidad paracelular. Las fosforilaciones de las claudinas pueden darse gracias a la acción directa o indirecta de varias cinasas, entre las que destacan la proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), la proteína Ras y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) dentro de las cuales se encuentran las cinasas reguladas por señales extracelulares, ERK 1/2, que generalmente están activadas en varios tipos de cáncer [11,34].

La función de barrera en las células endoteliales de pulmón requiere de la fosforilación de claudina 1 en el residuo de treonina 203. Esta fosforilación es mediada por la vía de las MAPK. Por otro lado, se ha observado que en células derivadas de cáncer de mama que expresan claudina 1 se altera la propiedad de invasión al bloquear la vía de MAPK a nivel de ERK 1/2 con inhibidores específicos [20]. Se ha reportado la fosforilación de claudina 1 por MAPK y PKC, así como la de claudina 5 por la proteína cinasa dependiente de AMPc. De la misma manera, se ha visto que la cinasa WNK4 fosforila a las claudinas 3 y 4 y disminuye la función de la UE.

Algunas citocinas y factores de crecimiento pueden alterar selectivamente a las UE impidiendo o fortaleciendo la función de barrera de los epitelios. El interferón gamma (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) inducen la internalización de claudina 1, 4 y ocludina, así como la disminución de la expresión de ZO-1 y la redistribución de ZO-2, aumentando la permeabilidad paracelular de manera independiente a la cascada de señalización apoptótica inducida por citocinas en un modelo epitelial de intestino. Otras vías de señalización que regulan la función de las UE pueden regular también el destino y la función de las diferentes claudinas.

Cuadro 1. Efectos en la expresión de claudinas y función de las UE por distintos efectores.

EFFECTOR	CLAUDINAS	CÉLULAS/TEJIDO	FUNCIÓN	MECANISMO
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Cldn-2↓ Cldn-1, -3, -4 ↑	Células de riñón MDCK II	TER ↑	MAPK/ERK1/2
Factor de crecimiento hepático (HGF)	Cldn-2↓ Cldn-2↑	MDCK II MDCK I	TER ↑ TER ↓	MAPK/ERK1/2
	Cldn-7↓	Células tumorales de mama MCF-7 y T47D	ND	Metilación del promotor
Factores de Transcripción GATA-4, CDX2, HNF1α CDX2, HNF1α HNF-4 α	Cldn-2↑	Células de adenocarcinoma de colon ,Caco-2 y de epitelio intestinal, HIEC	Mantiene expresión	Transcripción
	Cldn-2↑	Caco-2	ND	Transcripción
	Cldn-6, -7↑	Células de carcinoma embrionarias F9	Induce UE	-
Factor de transcripción Snail	Cldn-2, -4, -7↓ Cldn-1↓	MDCK II MDCK	TER ↓ ND	- Traducción
	Cldn-3, -4, -7↓	Células epiteliales de ratón Eph4 yCSG1	EMT	Transcripción
	IL-1β	Hígado, hepatocitos	ND	MAPK, PI3K
IL-17	Cldn-1, -2↑	Células de adenocarcinoma de colon T84	TER ↑	MEK
Hipoxia	Cldn-3↑	Células endoteliales de cordón umbilical HUVEC	ND	Transcripción
Interferón (INF), Factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1 β	Cldn-1↑	Caco-2	TER ↓	-
INF, TNF	Cldn-1 ↑, Cldn-2 ↓	MDCK	Flujo moléculas ↑ y TER	MEK 1, p38
AMPc	Internalización Cldn-1, -4	T84	TER ↓	-
	Fosforilación y Cldn-5 ↑	Células cerebrales endoteliales porcinas	TER ↑	PKA
TGF-β1	Cldn-1, -2 ↓	MDCK II	ND	ERK 1/2, PI3K, SNAIL

TER: Resistencia Transepitelial

El AMPc por ejemplo, induce un aumento en los niveles de claudina 5, así como su fosforilación vía PKA y la disminución de claudina 1 en células endoteliales porcinas. El AMPc altera la organización de las UE aumentando la función de barrera de las mismas [14,20]. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también es capaz de regular de manera diferencial la localización de las claudinas 1, 2, 4 y 7 en células epiteliales MDCK, aumentando la cantidad de claudinas 4 y 7 en las UE y relocalizando en el citosol a las claudinas 1 y 2, sin modificar a otras proteínas de las UE como ocludina, ZO-1 y ZO-3 [35].

Los cambios observados a nivel transcripcional incluyen modificaciones epigenéticas, como alteraciones en el grado de metilación de ciertos genes. Tal es el caso del gen de la claudina-7 en líneas de cáncer de mama, en las cuales el promotor de dicho gen se hipermetila. Dicha hipermetilación se ve acompañada de la pérdida de contactos celulares después del tratamiento con el factor de crecimiento hepático (HGF) [20]. El caso contrario se ha observado para el gen de claudina-4 en líneas celulares y carcinomas primarios de páncreas. En éstos, el gen de claudina-4 se encuentra hipometilado en comparación con tejidos y células pancreáticas normales, lo que da lugar a la sobreexpresión del mismo [36].

Algunos factores de transcripción han sido también identificados como reguladores de la expresión de varias claudinas, tal es el caso del factor nuclear de hepatocito 4 alfa (HNF-4 α), el cual regula positivamente la expresión de claudinas 6 y 7. La región proximal del promotor de claudina 2 tiene sitios de unión a los factores de transcripción LEF-TCF y Cdx1, dichos sitios pueden ser activados por la vía clásica de WNT. SNAIL es otro factor de transcripción que inhibe la expresión de claudinas 1, 3, 4 y 7, así como de la claudina, pero no de otros componentes de las UE, como ZO-1 [37]. Este factor de transcripción es necesario en la fase temprana de la embriogénesis y en la regulación de la transición epitelio-mesénquima (EMT) [20].

UE y cáncer

El 90 por ciento de los diferentes tipos de cáncer son de origen epitelial y se caracterizan por un crecimiento aberrante, pérdida de la diferenciación y de la arquitectura del tejido. Una diferencia con las células normales es que las células cancerosas presentan pérdida de los mecanismos de adhesión. La reducción en las interacciones célula-célula permite a las células cancerosas: 1) alterar la arquitectura del tejido provocando su destrucción final, una característica de la malignidad celular, y 2) en forma paralela, perturbar las vías de transducción de señales que regulan a este tipo de interacciones. Esto conlleva a la pérdida de la inhibición por contacto promoviendo las etapas temprana (pérdida de la polaridad celular y del control del crecimiento) y tardía (invasión y metástasis) en el desarrollo del tumor.

Durante el desarrollo tumoral suceden cambios genéticos que le confieren ventajas de crecimiento a las células, dando lugar a la conversión de células normales en células cancerosas, en las que se pierde la diferenciación y la polaridad celular. Este tipo de ventajas incluyen la autorregulación o autosuficiencia de factores de crecimiento, insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento celular, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis [38].

Un gran número de estudios han mostrado que los componentes de las UE están directa o indirectamente involucrados en las etapas que conllevan al progreso del cáncer [17].

Para el caso de las claudinas, los cambios en la expresión de estas proteínas, ya sea su aumento o disminución, se han asociado con varios tipos de tumores, desde el cáncer de mama hasta el cáncer de colon (Cuadro 2). Sin embargo, aunque se ha reportado el aumento en la expresión de varias claudinas, no en todos los casos se indica si la localización subcelular de las mismas se ve modificada y/o si dichos cambios alteran el número de contactos celulares presentes con respecto a los tejidos normales [39].

Cuadro 2. Expresión de claudinas en diferentes tipos de tumores.

CLAUDINA	NEOPLASIA	EXPRESIÓN	LOCALIZACIÓN
Cldn-1	Colon	↑	Citoplasma
	Mama	↓	ND
	Esófago de Barret	↓	ND
	Cervix	↑	ND
Cldn-3	Ovario	↑	Membrana plasmática y citoplasma
	Próstata	↑	¿? Difuso
	Mama	↑	ND
Cldn-4	Ovario	↑	Membrana plasmática y citoplasma
	Páncreas	↑	Membrana plasmática
	Estómago	↓	ND
	Mama	↑	ND
	Próstata	↑	ND
Cldn-6	Glándula mamaria	↓	ND
Cldn-7	Cabeza y cuello	↓	ND
	Mama	↓	Membrana plasmática
	Esófago (fenotipo invasivo)	↓	Membrana plasmática
	Estómago	↑	ND
	Cervix	↑	ND
Cldn-10	Hígado	↑	ND
	Tiroides	↑	ND
Cldn-16	Ovario	↑	ND
Cldn-23	Estómago	↓	ND
	Mama	↓	ND
	Páncreas	↓	ND

ND: No determinado

Transición epitelio-mesénquima y expresión de claudinas

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es el proceso en el cual las células epiteliales se diferencian a un fenotipo más fibroblástico. Este proceso se lleva a cabo en forma normal durante el desarrollo embrionario y en la reparación del daño epitelial [40]. La TEM incluye dos etapas, en la primera se observa una disminución en la adhesión intercelular, lo que le permite a las células disociarse unas de otras; y en la segunda se produce un incremento en la motilidad celular, permitiendo su migración a tejidos conectivos. La adquisición de estas características se encuentra asociada a la pérdida total de la polaridad celular, pérdida de la diferenciación y alteración de la función de las UE [37].

La EMT está asociada con cambios en la expresión y regulación de claudinas. La sobreexpresión del factor de transcripción SNAIL induce EMT e inhibe la transcripción de proteínas de las UE incluyendo claudinas y ocludina [37,41].

Análisis histológicos de tumores humanos han revelado cambios en la expresión de claudinas asociados con el fenotipo del tumor, lo que apoya la idea de que las UE se alteran durante la EMT y esto contribuye con el proceso de tumorigénesis [42]. Se ha reportado que los tumores están asociados con una disminución en la expresión de claudina-7 [43,44]. Sin embargo, hay estudios que muestran un aumento o una disminución en la expresión de Claudina-1. Parece que las Claudina-3 y -4 generalmente tienen una expresión aumentada, particularmente en tumores metastáticos agresivos, aunque hay sus excepciones [44].

UE y metástasis

El proceso de metástasis involucra la diseminación de las células cancerosas a tejidos u órganos lejos del lugar donde se originó el tumor, para formar nuevos tumores. La cascada metastásica puede ser dividida en tres procesos principales: invasión, intravasación y extravasación. El proceso de *invasión* requiere que las células tumorales pierdan su capacidad de adhesión célula-célula y se disocien a partir del tumor primario. Esto involucra la secreción de sustancias que degradan la membrana basal y la matriz extracelular, así como la expresión e inhibición de proteínas involucradas en el control de la motilidad y migración celular. Posteriormente, las células tumorales deben entrar al sistema circulatorio, sobrevivir a las fuerzas internas y al sistema inmune para llegar intactas a sitios distantes específicos. Ya en ese lugar, el punto de *intravasación*, interactúan con las células endoteliales mediante interacciones bioquímicas (carbohidrato-carbohidrato, las cuales son débiles pero ocurren rápidamente), se adhieren a las células endoteliales para formar uniones más fuertes y penetran a través del endotelio a la membrana basal, proceso de *extravasación*. Las células tumorales pueden entonces proliferar en este lugar dando lugar a nuevos tumores. Dado que las células cancerosas, las células del estroma y las células del endotelio todas poseen UE, estas uniones son el primer impedimento para que la metástasis sea exitosa, por lo que la interacción con el endotelio y la penetración a través del mismo es una etapa clave. Aun cuando se sabe que numerosos eventos contribuyen al proceso de metástasis, está bien aceptado que la pérdida de la adhesión célula-célula favorece el avance de las células tumorales las cuales necesitan alterar y dismantelar a las UE [17]. Se ha sugerido que el debilitamiento de las UE es un evento tardío en la carcinogénesis epitelial permitiendo el paso de factores de crecimiento, que normalmente se encuentran en el espacio luminal, al espacio intercelular y de fluido intersticial lo que favorece su unión con receptores localizados únicamente en la membrana basolateral provocando alteraciones en el microambiente celular que promueven el progreso tumoral [45] (Figura 5).

Otro de los eventos importantes que se llevan a cabo durante el proceso de invasión y metástasis, es la activación de proteasas extracelulares. Por ejemplo, se encuentra ampliamente estudiado el papel que juegan algunas proteínas involucradas en la adhesión célula-célula, como la E-caderina, la cual está inhibida o desaparece en la mayoría de los cánceres epiteliales, impidiendo la transmisión de señales que inhiben el crecimiento. Poco se sabe sobre el papel que tienen las proteínas de las UE en estos procesos, aunque se han reportado cambios en la expresión y localización de algunas claudinas con fenotipos más invasivos de diferentes tipos de cáncer.

Las claudinas 1, 2, 3, 4 y 5 reclutan y promueven la activación de metaloproteinasas (MMP), lo que sugiere también el papel de estas proteínas en la invasividad y metástasis [46]. El aumento en la expresión de estas claudinas en algunos tipos de cáncer (como cáncer de colon, ovario, páncreas y adenocarcinoma gástrico) se ha asociado a un aumento en la capacidad invasiva de dichos carcinomas, como resultado del aumento en la actividad de la MMP-2. En el cáncer de mama, la disminución en la expresión de las claudinas se ha relacionado con mayor invasividad y peor prognosis.

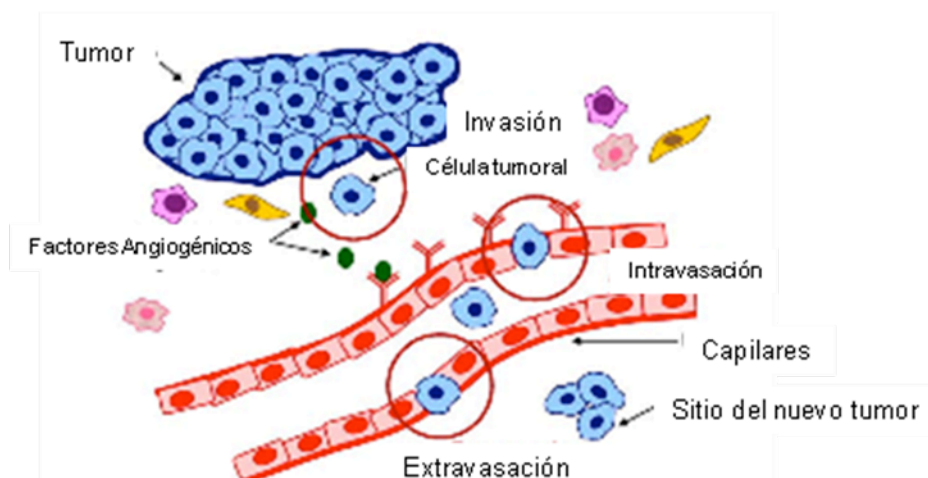


Figura 5. Durante la cascada metastática la alteración de las UE ocurre al nivel de: 1) la separación de las células tumorales a partir del tumor primario, 2) la etapa de intravasación de la célula tumoral a través del endotelio y 3) la etapa de extravasación de la célula tumoral circulante. (Tomado de [17]).

La internalización de las claudinas, pero no de otras proteínas asociadas a las UE, como ocludina o ZO-1 se ha visto asociada durante el movimiento de las células en el proceso de embriogénesis y de remodelaje tisular [47], lo mismo que en fases avanzadas de algunos tipos de cáncer. Debido a que las interacciones célula-célula y célula-ECM son necesarias para la sobrevivencia celular y estas interacciones se pierden durante la invasión de una célula a los tejidos, se podría sugerir que la internalización de las claudinas sería una manera de evadir que la célula perciba cambios en estas interacciones, como sucede con la disminución de la expresión de E-caderina. Esto le permitiría a las células evadir procesos apoptóticos, e inhibir la interacción de estas claudinas con otras de las células que la rodean, que inicialmente impediría el movimiento de la misma.

En el cáncer de páncreas tubular y coloidal se ha observado un aumento significativo en los niveles de ARNm y de proteína para claudina 4 en aquellas fases invasivas [20]. En células derivadas de tumor primario y metástasis de cáncer de colon, el aumento en expresión de claudina 1 y su deslocalización de la membrana plasmática al citoplasma y núcleo se asocia con el poder de invasividad de estas células [46].

Perspectivas

El conocimiento sobre el papel funcional de las UE y en particular de las claudinas en el mantenimiento de la función de barrera y en la homeostasis es cada vez más sólido. Sin embargo, todavía quedan muchas preguntas por contestar acerca de la regulación de estas proteínas. Se conocen algunos de los elementos necesarios para el ensamble de las claudinas en las UE, como lo es la presencia de proteínas de anclaje, sin embargo a la fecha se desconocen los mecanismos involucrados en este proceso. En particular, se desconoce en que compartimientos intracelulares se ensamblan las claudinas, cuáles son los determinantes que definen las interacciones homotípicas y heterotípicas, cómo la diversidad de claudinas puede influir en la permeabilidad paracelular y si los cambios en la expresión de las claudinas son una causa o una consecuencia de la carcinogénesis. Las discrepancias observadas en la expresión de las claudinas en el proceso de tumorigénesis pueden estar relacionadas a las diferencias tejido-específicas o a las características microambientales. Sin embargo, el papel que puedan jugar estas proteínas en los mecanismos de proliferación, migración e invasividad celular,

sugieren que las claudinas pueden tener múltiples funciones, más allá de regular únicamente la barrera paracelular.

Referencias

1. Will, C., Fromm, M. y Müller, D. (2008) *Periton. Dialis. Int.* **28**, 577-584
2. Schneeberger, E.E. y Lynch, R.D. (2004) *Am. J. Physiol Cell Physiol.* **286**, C1213-C1228
3. Findley, MK, y Koval, M. (2009) *IUBMB Life* **61**, 431-437
4. Mullin, J.M. (2004) *Sci.STKE.* 216, pe2
5. Mullin, J.M., Agostino, N., Rendon-Huerta, E. y Thornton, J.J. (2005) *Drug Discov. Today* **10**, 395-408
6. Turksen, K. y Troy, T.C. (2004) *J. Cell Science* **117**, 2435-2447
7. Glick, A.B. y Yuspa, S.H. (2005) *Semin. Cancer Biol.* **15**, 75-83
8. Utech, M., Mennigen, R. y Bruewer, M. (2010) *J. Biomed. Biotech.* **2010**, 484987
9. Qu, Y. y Dahl, G. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 697-70
10. Denker, B.M. y Nigam, S.K. (1998) *Am. J. Physiol.* **274**, F1-F9
11. Furuse, M. y Tsukita, S. (2006) *Trends Cell Biol.* **16**, 181-188
12. Mitic, L.L., Van Itallie, C.M. y Anderson, J.M. (2000) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, G250-G254
13. Chlenski, A., Ketels, K.V., Tsao, M.S., Talamonti, M.S., Anderson, M.R., Oyasu, R. y Scarpelli, D.G. (1999) *Int. J. Cancer* **82**, 137-144
14. Nusrat, A., Turner, J.R. y Madara, J.L. (2000) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, G851-G857
15. Van Itallie, C.M. y Anderson, J.M. (2006) *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 403-429
16. Turner J.R. (2009). *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 799-809
17. Martin, I.A. y Jiang, W.G. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 872-891
18. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. y Jaramillo, B.E. (2003) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81**, 1-44
19. Fanning, A.S., Mitic, L.L. y Anderson, J.M. (1999) *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1337-45
20. Swisshelm, K., Macek, R. y Kubbies, M. (2005) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 919-928
21. Furuse, M., Sasaki, H. y Tsukita, S. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 891-903
22. Lal-Nag, M. y Morin, P. J. (2009) *Genome Biology* **10**, 235.1-235.7
23. Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D. y Rice, C.M. (2007) *Nature* **446**, 801-805
24. Piontek J. (2008) *FASEB J.* **22**, 146-158
25. Colegio, O.R., Van Itallie, C., Rahner, C. y Anderson, J.M. (2003) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C1346-C1354
26. Coyne, C.B., Gambling, T.M., Boucher, R.C., Carson, J.L. y Johnson, L.G. (2003) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **285**, L1166-78
27. Mitic, L.L., Unger, V.M. y Anderson, J.M. (2003) *Protein Sci.* **12**, 218-227
28. Umeda K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. y Tsukita, S. (2006) *Cell* **126**, 741-754
29. Itoh M., et al. (1999) *J. Cell. Biol.* **147**, 1351-1363
30. Van Itallie C.M., Colegio O.R. y Anderson J.M. (2004) *J. Membr. Biol.* **199**, 29-38
31. Fanning, A.S. Little, B.P., Rahner, C., Utepbergenov, D., Walther, Z. y Anderson JM. (2007) *Mol. Biol. Cell* **18**, 721-731
32. Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. y Tsukita, S. (2006) *Cell* **126**, 741-754
33. Nunes, F. D., Lopez, L. N., Lin, H. W., Davies, C., Azevedo, R. B., Gow, A. y Kachar, B. (2006) *J. Cell Sci.* **119**, 4819-4827
34. Chen, Y., Lu, Q., Schneeberger, E. E. y Goodenough, D. A. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 849-862
35. Flores-Benitez, D., Ruiz-Cabrera, A., Flores-Maldonado, C., Shoshani, L., Cerejido, M. y Contreras, R. G. (2007) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **292**, F828-F836

36. Sato, N., Fukushima, N., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., van Heek, N. T., Cameron, J. L., Yeo, C. J., Hruban, R. H. y Goggins, M. (2004) *Am. J. Pathol.* **164**, 903-914
37. Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M. y Tsukita, S. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 1959-1967
38. Hanahan, D. y Weinberg, R.A. (2000). *Cell* **100**, 57-70
39. Hewitt, K.J., Agarwal, R. y Morin, P.J. (2006) *BMC. Cancer* **6**, 186
40. Yang, J. y Weinberg, R.A. (2008) *Dev. Cell* **14**, 818-829
41. Carrozzino, F., Soulie, P., Huber, D., Mensi, N., Orci, L., Cano, A., Feraille, E. y Montesano, R. (2005) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C1002-C1014
42. Oliveira, S. S. y Morgado-Diaz, J. A. (2007) *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 17-28.
43. Sauer, T., Pedersen, M. K., Ebeltoft, K. y Naess, O. (2005) *Cytopathology*. **16**, 193-198
44. Montgomery, E., Mamelak, A. J., Gibson, M., Maitra, A., Sheikh, S., Amr, S. S., Yang, S., Brock, M., Forastiere, A., Zhang, S., Murphy, K. M. y Berg, K. D. (2006). *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **14**, 24-30
45. Mullin, J.M., Laughlin J.V., Gianni N, Marano C.W., Clarke H.M, Peralta J.S. y Soler, A. (2000) *Ann. NY Acad. Sci.* **915**, 231-236
46. Dhawan, P., Singh, A.B., Deane, N.G., No, Y., Shiou, S.R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M.K. y Beauchamp, R.D. (2005) *J. Clin. Invest* **115**, 1765-1776
47. Matsuda, M., Kubo, A., Furuse, M. y Tsukita, S. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 1247-1257
48. Groschwitz, K.R. y Hogan S.P. (2009) *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 3-20

Semblanza de la Dra. Erika P. Rendón Huerta



La Dra. Rendón es Bióloga egresada de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realizó sus estudios de Maestría y Doctorado en Investigación Biomédica Básica, también en la UNAM. Posteriormente, realizó una estancia Posdoctoral en el Lankenau Institute for Medical Research, PA en donde inició los proyectos básico-clínicos. Actualmente es Profesor de tiempo completo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM y es miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Desde sus estudios de posgrado ha trabajado en diferentes aspectos de la regulación de proteínas transmembranales y su regulación por vías de transducción. Actualmente tiene proyectos en colaboración con Hospitales y su principal interés es el estudio del papel de proteínas transmembranales de las uniones estrechas, claudinas, en el inicio y progreso del cáncer.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 17-30. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

ASPECTOS BIOQUÍMICOS, ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS GALECTINAS EN LA INMUNIDAD

Gerardo R. Vasta

Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Maryland
Facultad de Medicina, IMET/UMBI, Baltimore, MD 21202
vasta@umbi.umd.edu

Resumen

Los glicanos solubles o asociados a la superficie celular codifican información compleja que modula las interacciones entre las células o entre las células y la matriz extracelular, mediante la regulación específica de la unión a receptores solubles o unidos a carbohidratos asociados a la superficie celular, tales como las galectinas. Desde su descubrimiento en los 1970's, sus papeles biológicos, inicialmente entendidos como limitados al reconocimiento de ligandos de carbohidrato endógenos (propios) en la embriogénesis y el desarrollo, se han expandido en años recientes gracias al descubrimiento de sus actividades inmunoreguladoras. En los últimos años ha ocurrido un cambio gradual del paradigma debido al reconocimiento de que las galectinas también se unen a los glicanos de superficie de los microbios potencialmente patógenos, y de que las galectinas también funcionan como factores efectores y de reconocimiento en la inmunidad innata. Además, se ha descubierto un nivel adicional de complejidad funcional con los hallazgos más recientes en relación a que algunos parásitos "subvierten" los papeles de reconocimiento de las galectinas del vector/huesped para lograr una adherencia exitosa o para invadir.

Palabras clave: Galectinas, reconocimiento celular, inmunidad innata.

Abstract

Humoral and cell surface glycans encode complex information that modulates interactions between cells, or between cells and the extracellular matrix, by specifically regulating the binding to soluble or cell surface-associated carbohydrate-binding receptors, such as galectins. Since their discovery in the 1970s, their biological roles, initially understood as limited to recognition of endogenous (“self”) carbohydrate ligands in embryogenesis and development, have expanded in recent years by the discovery of their immunoregulatory activities. A gradual paradigm shift has taken place in the past few years through the recognition that galectins also bind glycans on the surface of potentially pathogenic microbes, and function as recognition and effector factors in innate immunity. Further, an additional level of functional complexity has emerged with the most recent findings that some parasites “subvert” the recognition roles of the vector/host galectins for successful attachment or invasion.

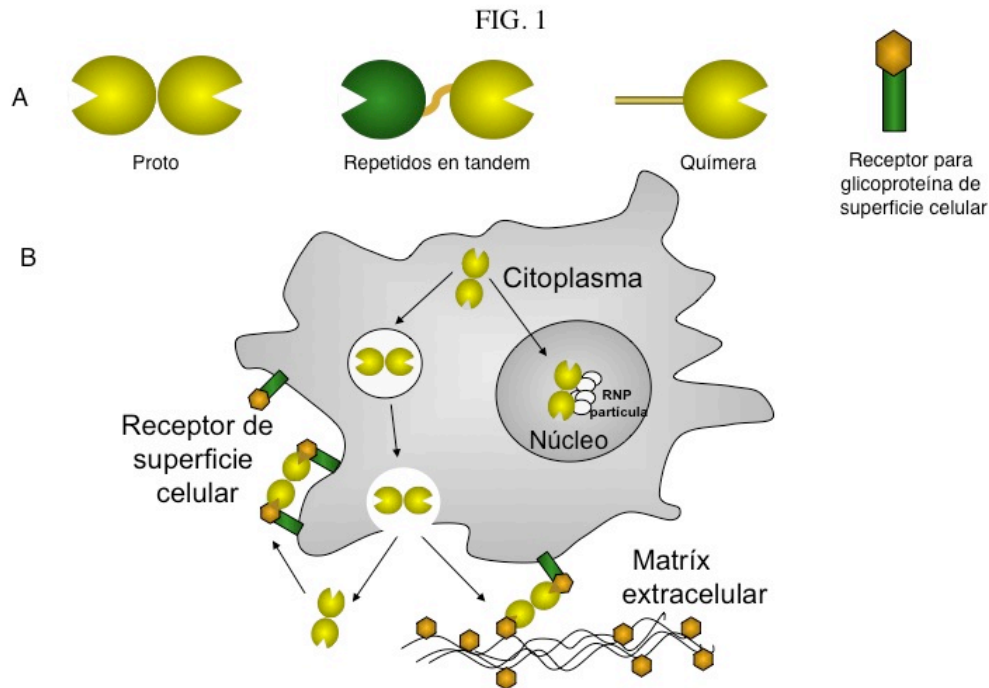
Keywords: Galectins, cell recognition, innate immunity.

Estructura y propiedades bioquímicas de las galectinas

La estructura de los carbohidratos complejos codifican información que modula las interacciones entre las células o entre las células y la matriz extracelular (ECM) mediante su unión específica a proteínas unidas a carbohidratos tales como las galectinas, anteriormente llamadas lectinas tipo-S [1]). Las galectinas constituyen una familia de proteínas unidas a β -galactósidos, conservada durante la evolución, que se encuentran en la taxa eucariota. Incluyendo a los parazoos (esponjas) así como los linajes prototoma y deuterostoma de los metazoos y a los hongos [2,3]. Se requiere que una proteína tenga dos propiedades para incluirse en la familia de las galectinas: a) una afinidad característica por los β -galactósidos y b) una secuencia dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) conservada. Las galectinas han sido clasificadas en tres tipos con base en sus características estructurales: “proto”, “quimera” y “repetidos en tandem” (Fig. 1.A) [4]. El tipo proto de las galectinas contiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos por subunidad y son homodímeros no unidos covalentemente. Las galectinas quimera tienen un DRC C-terminal y un dominio N-terminal rico en prolina y glicina. En las galectinas con repetición en tandem (RT) dos DRCs están unidos por un péptido funcional de unión. Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de galectina RT con cuatro DRCs [5]. La dimerización de galectinas de tipo proto es crítica para su función en las interacciones mediadas por uniones célula a célula o célula-ECM [1]. Interacciones similares vía el dominio N-terminal se han propuesto para las galectinas quimera [6, 7]. Los tipos proto y de repetición en tandem comprenden varios subtipos de diferentes galectinas. Los subtipos de galectinas se han numerado siguiendo el orden en que son descubiertas y hasta ahora se han descrito 15 en los mamíferos. Las galectinas 1, -2, -3, -4, -5, -7, -10, -11, -13, -14 y -15 son del tipo proto. La galectina -3 es la única del tipo quimera. Las galectinas -4, -6, -8, -9 y -12 son del tipo repetición en tandem. Parece que los vertebrados inferiores y los invertebrados tienen un repertorio más pequeño de galectinas.

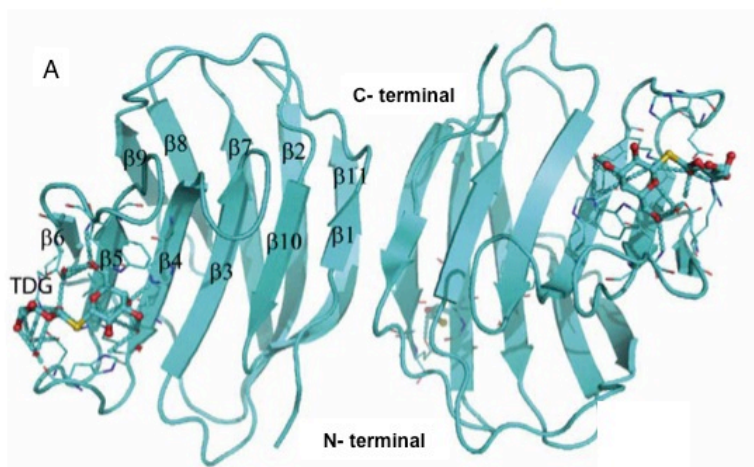
Aunque las galectinas carecen de una secreción típica de un péptido de señal, no sólo están presentes en el citoplasma y en el núcleo, sino que también en el espacio extracelular [2]. Desde el citosol se puede dirigir a las galectinas para secreción a través de mecanismos no clásicos, posiblemente mediante su traslocación a través de la membrana celular [8-11] (Fig 1.B).

La estructura de la galectina-1 [12,13] unida a un di-galactósido (Fig. 2) muestra una topología típica de las lectinas de las legumbres. La subunidad de galectina está compuesta por un β -sandwich antiparalelo de 11 filamentos y contiene un DRC. La estructura tridimensional del complejo galectina-ligando nos permitió identificar a los aminoácidos que participan en las interacciones con los ligandos, así como la posición y orientación de los azúcares hidroxilo que interactúan con los aminoácidos [12,13].



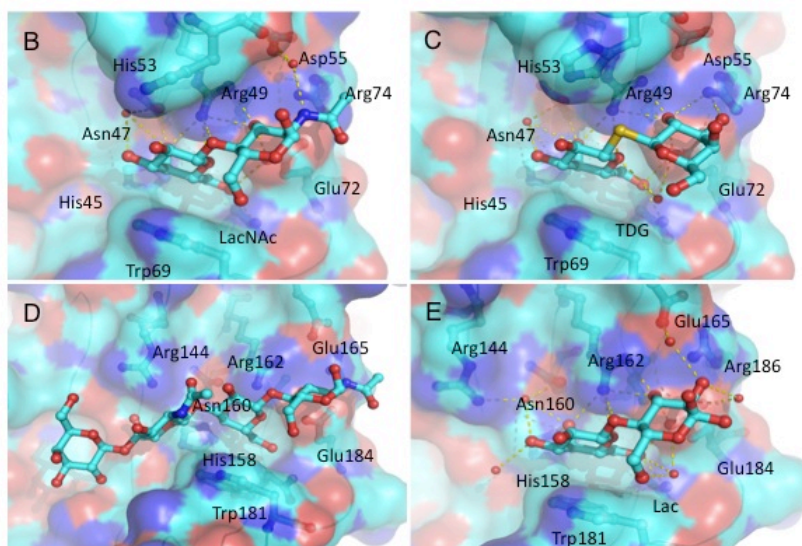
La mayoría de las galectinas son proteínas no-glicosiladas solubles, aunque algunas pocas excepciones recientemente descubiertas tienen dominios transmembranales [14, 15]. La presencia de un pliegue de galectina en el parásito protozoario *Toxoplasma gondii* y las proteínas parecidas a la galectina en el hongo *Coprinopsis cinerea* y en la esponja *Geodia cydonium* revelan la emergencia temprana y conservación estructural de las galectinas en la evolución de los eucariontes [16-18]. En contraste, las proteínas parecidas a la galectina tales como la proteína cristalizada GRIFIN del cristalino (proteína interfibrosa relacionada con las galectinas) y la proteína GRP relacionada con las galectinas (anteriormente llamada HSPC159; precursor de las células progenitoras hematopoiéticas) carecen de actividad de unión a carbohidratos y se consideran productos de co-opción evolutiva [19, 20]. Las estructuras primarias y la organización genética de las galectinas de mamíferos han sido conservadas substancialmente. Antes de, o durante la evolución temprana de los cordados La duplicación de un gen de galectina mono-DRC habría llevado a la formación de un gen de galectina bi-DRC, en el cual los DRCs N- y C-terminales posteriormente se bifurcaron en dos subtipos diferentes, definidos por su estructura exón-intrón (F4-DRC y F3-DRC). Todos los vertebrados con galectinas con un solo DRC pertenecen o al subtipo F3 (ej. Gal-1, -2, -3, -5) o al F4 (ej. Gal-7, -10, -13, -14), mientras que las galectinas con repetición en tandem, tales como las gal-4, -6-, -8, -9 y -12 contienen tanto subtipos F3 como F4 [21].

FIG. 2



Las galectinas son lectinas unidas a β -galactósidos y sus ligandos preferidos son las N-acetil-lactosaminas (LacNAc; Gal β 1,4GlcNAc) y los disacáridos relacionados con constantes de disociación del orden de 10^{-5} M [22,23]. La unión específica de las galectinas a la lactosa (Lac), LacNAc, T-disacáridos (Gal β 1,3GalNAc) y el tetrasacárido del grupo sanguíneo humano A, junto con la presencia de residuos de aminoácidos que interactúan con los ligandos de carbohidratos, han permitido la clasificación de sus DRCs en los tipos “conservados” y “variables” [24]. La estructura del cristal de la galectina-1 (tipo conservado) en complejo con un di-galactósido determinado a una resolución de 1.9 Å (Fig. 2) reveló el pliegue estructural de la galectina y permitió la identificación de los aminoácidos involucrados y de los grupos hidroxilo de los ligandos que participan en las interacciones entre proteínas y carbohidratos [12, 13, 25]. El sitio de unión a carbohidratos (Fig. 3.A) está formado por tres filamentos cóncavos continuos (β 4- β 6) que contienen todos los residuos involucrados en las interacciones directas con LacNAc (Fig.3.B, C). Las interacciones adicionales que incluyen una molécula de agua que forma un puente entre el nitrógeno del grupo Nac con His⁵², Asp⁵⁴ y Arg⁷³ explica la mayor afinidad de LacNAc que de Lac. A diferencia de la galectina-1, la galectina-3 tiene un sitio de unión a carbohidratos extendido formado por una hendidura abierta en ambos extremos en la que el LacNAc es colocado de tal forma que el extremo reducido del LacNAc (GlcNAc) está abierto al solvente, pero la fracción no reducida (Gal) está muy cercana a los residuos del filamento β 3 [26] (Fig.3.D). El sitio de unión extendido conduce a una mayor afinidad por los glicanos con múltiples unidades de lactosamina y con la sustitución de la fracción de la galactosa terminal no reducida por los oligosacáridos de los grupos sanguíneos ABH [Fuca α 1,2; GalNAca α 1,3(Fuca α 1,2); and Gal α 1,3(Fuca α 1,2)]. Para la galectina de 16 kDa (del tipo variable) del nematodo *Caenorhabditis elegans*, la menor longitud de las asas que conectan a los tres filamentos β 4- β 6 determina su especificidad de unión más amplia para los oligosacáridos precursores de grupos sanguíneos. Por consiguiente, aunque las galectinas se consideran como una familia de lectinas conservadas, la mayoría de los metazoarios están dotados de un complejo repertorio de galectinas con miembros que exhiben múltiples isoformas y más o menos sutiles variaciones en su especificidad por carbohidratos lo cual, junto con un cierto grado de plasticidad en su unión a los azúcares de cada DRC (Fig.3.B.C) sugiere una diversidad substancial en sus propiedades de reconocimiento [27-32].

FIG. 3



Se han realizado estudios termodinámicos no sólo para evaluar las propiedades de unión de las galectinas a los carbohidratos sino también para analizar la organización oligomérica de la proteína. En estudios microcalorimétricos, las constantes de disociación para las interacciones de la galectina-1 bovina con los ligandos preferidos (lactosa, N-acetyl-lactosamina, tiodigalactósidos) estuvieron en el rango de 10^{-5} M, con dos sitios de unión por molécula [23]. Aunque las galectinas y las lectinas de las legumbres muestran una sorprendente similitud en sus estructuras tridimensionales, la estabilidad térmica de la galectina es diferente de la de la concavalina A (Con A). Al igual que la Con A no se disocia al desenrollarse [23].

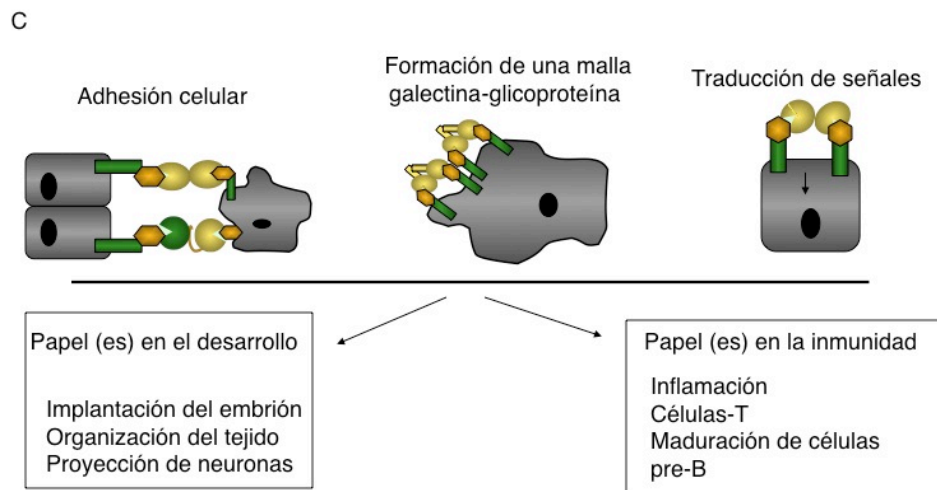
Papeles biológicos de las galectinas

Inicialmente se pensó que las galectinas sólo se unían a glicanos endógenos (“propios”) y mediaban los procesos de desarrollo incluyendo la diferenciación celular y la organización tisular y, más recientemente, la regulación de la homeostasis inmune [33, 34] (Fig. 4). Sin embargo, recientemente ha quedado claro que las galectinas también se unen a los glicanos de superficie de microbios potencialmente patógenos y de gusanos parásitos y que median las funciones de reconocimiento y efectoras de la inmunidad innata [35].

Los glicanos que contienen cadenas de polilactosamina [(Gal β 1,4GlcNAc) n], tales como la laminina, la fibronectina, las proteínas de membrana asociadas a los lisosomas, y las mucinas, son los ligandos endógenos preferidos de las galectinas de los mamíferos, las aves y los anfibios [26-32]. No obstante, la función biológica de una galectina particular puede variar de un lugar a otro, dependiendo de la disponibilidad de los ligandos apropiados. Sin embargo, las propiedades de unión y las funciones biológicas de las galectinas en el ambiente extracelular oxidativo, pueden depender de su unión inmediata al ligando, lo que previene la oxidación de los residuos de cisteína libres, así como de la susceptibilidad a la proteólisis [12,25]. La unión de las galectinas a los glucolípidos de la superficie celular que contienen β -galactósido y glicoproteínas, puede conducir a la formación de redes que agrupan a estos ligandos en microdominios raft (en balsa) de lípidos que se requieren para la transmisión óptima de señales

relevantes para la función celular [36-38] (Fig. 4). Las galectinas en solución pueden formar especies multivalentes en un equilibrio dependiente de la concentración [39]. Las galectinas de tipo proto se asocian como dímeros unidos de forma no covalente a través de una interfase hidrofóbica, mientras que la galectina-3 se asocia vía su dominio N-terminal para formar oligómeros que en la presencia de oligosacáridos multivalentes en solución o en la superficie celular despliegan una cooperación para el enlace [40,41]. Las galectinas bivalentes de tipo repetición en tándem pueden reconocer diferentes ligandos sacáridos con un polipéptido sencillo, aunque también pueden formar agregados de orden más elevado que mejoran su afinidad. El ensamble de galectinas mediadas por rafts de lípidos que modulan el recambio de receptores endocíticos, señalizar vías de transducción que conducen a la activación de células T y secreción de citocinas, o a la apoptosis, maduración de células B, activación y tolerancia, y la activación de neutrófilos que conduce a la fagocitosis, estallamiento oxidativo, y liberación de proteasas y citocinas. Así, se ha propuesto que las redes de galectina-glicoproteína en la superficie celular funcionan como un “interruptor de encendido-apagado” que regula la proliferación celular, la diferenciación y supervivencia, incluyendo la respuesta inmune y la tolerancia [40,41].

FIG. 4



Funciones en el desarrollo temprano

Se ha propuesto que las galectinas participan en diversas funciones biológicas relacionadas con el desarrollo y la neoplasia. Esto se ha basado en su unión a las fracciones “propias” de los carbohidratos, tales como los glicanos que contienen polilactosamina y que abundan en la superficie celular y el ECM. Se ha propuesto que las galectinas de pollo participan en la fusión de mioblastos, mientras que las galectinas-1 y -3 de murinos tendrían algún papel en el desarrollo de la notocorda, en la somitogénesis, y en el desarrollo del tejido muscular y del sistema nervioso central [42-45]. A pesar de la amplia disponibilidad de ratones genéticamente modificados, las cepas que carecen de mutaciones para las galectinas no han podido manifestar fenotipos overt, debido probablemente a la superposición parcial de la función de las galectinas [46-48]. Así, otros modelos tratables genéticamente dotados con un repertorio menos diversificado de galectinas tales como la *Drosophila* y el pez zebra se han convertido en atracciones alternativas para estas galectinas selectas con resultados prometedores [49-50].

Funciones en la inmunidad innata y adaptada

Las galectinas participan en la regulación de la inmunidad innata y adaptada [51-53]. Los papeles recientemente propuestos de las galectinas en las funciones inmunes han recibido mayor soporte por su habilidad de reconocer directamente a los patógenos microbianos [51], una propiedad bien caracterizada en otros tipos de lectinas, tales como las C- y F-lectinas, las ficolinas y las pentraxinas. Aunque los papeles de las lectinas en el reconocimiento no autólogo son particularmente críticas en los invertebrados, puesto que estos organismos carecen de inmunoglobulinas y rara vez dependen de los mecanismos de la inmunidad innata únicamente para el reconocimiento de patógenos microbianos potenciales [54], la susceptibilidad/resistencia a varias enfermedades infecciosas en los humanos están determinadas por la presencia de ciertos alelos de lectinas [55]. Las galectinas tanto de vertebrados como de invertebrados reconocen varios patógenos virales y bacterianos y protozoarios parásitos [Revisado en 51].

Las galectinas están localizadas y distribuidas de forma precisa en los tejidos de mamíferos, incluyendo la mayoría de las células del sistema inmune innato (células dendríticas, macrófagos, células mastoides, células asesinas naturales, células T gamma/delta y células B-1) y adaptado (células B y T activadas), así como en otros tipos celulares [56, 57]. Desde principios de los noventa el cuerpo de evidencia experimental (*in vitro* e *in vivo*) ha aumentado para apoyar los papeles de las galectinas expresadas por estas células y por las células del estroma circundante en el desarrollo y regulación de la homeostasis inmune innata y adaptada, así como en las respuestas a los retos infecciosos y alérgicos y al cáncer. Las galectinas liberadas por las células del estroma de compartimentos centrales contribuyen a la diferenciación de los precursores de las células inmunes. El desafío inmune y las diferentes condiciones patológicas pueden conducir a una posterior activación y diferenciación de las células inmunes, y modular la expresión y liberación de las galectinas al espacio extracelular donde pueden tener efectos autocrinos o paracrinos sobre la regulación inmune. Las galectinas liberadas por las células inmunes pueden formar oligómeros y construir redes en la superficie celular que conducen a la activación de las vías de señalización transmembranales que modulan las funciones de las células inmunes, incluyendo, por ejemplo, la adhesión y migración celulares, la apoptosis de células T, y el equilibrio de citocinas Th1/Th2 [36]. Además, las galectinas liberadas en el ambiente extracelular bajo condiciones anormales pueden constituir “señales de peligro” o, ejercer su actividad sobre otras células, mediante las mastoides, inducir la desgranulación y liberación de factores (histamina, por ejemplo) que representan las “señales de peligro” que conducen a la activación de los mecanismos inmunes en la ausencia del reto antigénico [35].

Las galectinas tienen diversos efectos sobre las células involucradas en las respuestas inmunes innatas, incluyendo a los macrófagos y a las células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos y células mastoideas. La galectina-1 participa en la inflamación aguda y crónica y muestra actividades antiinflamatorias mediante el bloqueo o atenuación de los eventos de señalización que conducen a la infiltración, migración y reclutamiento de leucocitos [56]. También despliega otros efectos en la inmunidad innata, incluyendo la exposición de fosfatidilserina en la superficie celular de los neutrófilos activados, un proceso que conduce a la remoción de los neutrófilos por los fagocitos sin provocar apoptosis, y activación/desactivación de macrófagos en una forma que depende de la concentración. En contraste con los efectos antiinflamatorios de la galectina-1, la galectina-3 muestra actividades proinflamatorias. La galectina-3 normalmente se expresa en varios epitelios y células inflamatorias, tales como los macrófagos activados, las células dendríticas y las células de Kupffer, y es regulada positivamente durante la inflamación, y la proliferación y diferenciación celulares. La galectina-3 también exhibe actividad antiapoptótica para los macrófagos y mejora sus interacciones con los glicanos de la lámina basal, tales como la laminina y la fibronectina. Con todas estas observaciones sugieren firmemente que la galectina-3 mejora la supervivencia de los macrófagos y modula positivamente su reclutamiento y actividades antimicrobianas. La galectina-9 es un quimioatrayente selectivo para los eosinófilos, altamente expresado en varios tejidos del sistema inmune, tales como la médula ósea, el bazo, el timo y los nódulos linfáticos. La Gal-9 liberada de las células T activadas induce

la quimiotaxis, la activación, la actividad oxidativa y la desgranulación de los eosinófilos y la maduración de las células dendríticas (DCs) derivadas de los monocitos [58-61].

Respecto a las respuestas inmunes de adaptación, se ha propuesto que las galectinas son reguladores de la homeostasis de las células inmunes [52]. Las interacciones entre las células del estroma de la médula ósea y los compartimentos tímicos y los precursores linfocíticos son críticos para su desarrollo, selección y posterior progreso hacia la periferia. En este aspecto, las interacciones mediadas por galectinas pueden modular la maduración y diferenciación de las células B en los compartimentos inmunes tanto centrales como periféricos [62]. De forma similar, desde sus etapas tempranas de desarrollo en el compartimento tímico hasta la remoción de las células T activadas maduras en la periferia, la regulación de la supervivencia de las células T es crítica para una respuesta inmune controlada. La galectina-1 puede regular la proliferación de las células T y la apoptosis a través de la unión y agrupamiento de los glicoconjugados de la superficie celular ricos en lactosamina hacia los microdominios de membrana segregados [36]. La galectina-1 puede tener efectos pro- y anti-apoptóticos sobre las células T dependiendo de la etapa de desarrollo y el estado de activación de la célula, y el microambiente en el que tiene lugar la exposición. No obstante, los efectos de la galectina-3 en la supervivencia de la célula T, dependen de si la proteína se produce endógenamente (anti-apoptótica) o por exposición exógena (pro-apoptótica) [60]. Las galectinas también ejercen funciones reguladoras en la homeostasis de las células T y en las cascadas de señales provocadas por su unión, mientras que la formación de redes en la superficie de las células T tiene implicaciones en varios eventos “corriente abajo” que modulan su diferenciación, activación funcional y producción de citocinas anti- y pro-inflamatorias. Los efectos de las galectinas sobre la síntesis de citocinas por las células T cuya secreción final determina la polarización de Th1/Th2 de la respuesta inmune. Mediante la reducción de IFN- γ y IL-2 y la producción aumentada de IL-5, IL-10 and TGF- β , la galectina-1 desvía el equilibrio de una respuesta Th1-polarizada hacia una respuesta Th2, mientras que al reducir los niveles de IL-5, la galectina-3 tiene el efecto opuesto [63]. Finalmente, dados los papeles reguladores de las galectinas sobre las células que median la respuesta inmunológica tanto innata como adaptativa, sus efectos pueden ser benéficos o perjudiciales en condiciones patológicas que se basan en una respuesta inmune exacerbada o disminuida. Por ejemplo, desórdenes inflamatorios, inmunológicos y autoinmunes, además del cáncer [63].

Las galectinas como receptores con patrones de reconocimiento (RRPs)

Recientemente se descubrió que las galectinas se unen a glicanos de la superficie de virus, bacterias, protistas y hongos [Revisado en 51]. Así, el papel potencial de las galectinas como RRP se ha convertido en un área de creciente atención. Además, la considerable diversidad del repertorio de galectinas en cada organismo y las variaciones substanciales o sutiles en la especificidad de cada galectina en relación con sus glicanos blanco, que es determinada por las repeticiones, ramificaciones o sustituciones de oligosacáridos, sugiere que existe una extensa diversidad y plasticidad en la capacidad de las galectinas para el reconocimiento no autólogo. La presencia de DRCs canónicos y extendidos junto con las propiedades de unión independientes de carbohidratos que tiene la región N-terminal de la galectina-3, también sugiere que las galectinas tienen una capacidad de reconocimiento diversificada substancialmente. Asimismo, las galectinas de todos los tres tipos (proto, quimera o repetición en tandem) pueden formar oligómeros, mientras que sus propiedades de unión multivalente, incluyendo afinidad incrementada. Evidentemente, capacitan a las galectinas para participar efectivamente, tanto en el reconocimiento directo de patógenos y parásitos como en los procesos de “corriente abajo” que llevan a la modulación de las respuestas innata y adaptativa. Si el reconocimiento mediado por galectinas es un mecanismo de defensa efectivo con un claro beneficio para el hospedero o no todavía está por aclararse, excepto en unos pocos ejemplos. Es digno de mencionar que un glicano particular en la superficie de un microorganismo o parásito puede ser reconocido por múltiples galectinas y que el resultado de la interacción difiere considerablemente dependiendo de el tipo de galectina involucrada y de la concentración

de la galectina en una superficie celular específica o en un determinado microambiente extracelular. Esto, en cambio, determina el nivel de formación de oligómeros y la cooperación de unión al ligando y la activación potencialmente antagonista o sinergista de las vías de señales de patógenos (por ejemplo, la modulación de la activación inmune o la producción y secreción de citocinas) [36].

Infección del hospedero mediada por galectinas inducida por patógenos y parásitos

En algunos casos, el reconocimiento de microbios por las galectinas del vector o del hospedero promueve su adhesión, la entrada a la célula del hospedero o la persistencia de la infección, además de modular la respuesta inmune del hospedero. Así, estos patógenos y parásitos “subvertirían” los papeles de las galectinas como RRP del hospedero o del vector para adherirse o lograr entrar a las células de éstos. Esto se ilustra claramente, por la participación de las interacciones de galectinas en los mecanismos de infección del VIH (Fig. 5). En contraste con el papel inhibitorio de la galectina-1 en la fusión celular mediada por paramixovirus (Fig. 5 a), la galectina-1, que abunda en los órganos que representan los principales reservorios del VIH-1, tales como el timo y los nódulos linfáticos, promueven la infección por VIH-1 al facilitar la adhesión del virus al receptor CD4 y aumentar la eficacia de la infección [64, 65] (Fig. 5b). Estudios recientes mostraron que la galectina-1 aumenta la cinética de adsorción del VIH en los monocitos derivados de los macrófagos del hospedero, lo que facilita la infectividad del VIH-1 al acortar el tiempo requerido para el establecimiento de la infección. Además, la galectina-1 también funcionaría como un receptor soluble “tipo basurero” e incrementa la ingestión del virus por los macrófagos que, junto con la evidencia de que la galectina-1 está presente en el eyaculado y las cabezas y colas de las espermátides tardías, llevó a extender la propuesta de que la galectina-1 también puede facilitar la transmisión sexual del VIH-1 [65]. Esto ocurriría al aumentar la cinética de adsorción viral en la superficie de las células blanco por la galectina-1 liberada por los fibroblastos y células epiteliales destruidos tras las micro-abrasiones relacionadas con el sexo. La Gal-3 no tiene efecto sobre la adsorción, entrada o infección por el VIH-1, aunque su expresión es regulada positivamente por la proteína Tat del VIH en muchas líneas celulares humanas y en células infectadas con otros retrovirus, lo que sugiere que la Gal-3 puede participar en la regulación de la inmunidad antiviral [66-68]. Esto subraya la relevancia de las sutiles diferencias en la especificidad y afinidad de las galectinas que puede determinar reconocimientos diferentes y resultados diferentes. Debe notarse que el VIH también utiliza el reconocimiento por DC-SIGN, una lectina tipo C, para entrar a las células dendríticas, subrayando las múltiples adaptaciones del glicoma viral para la infección del hospedero [64, 65].

Las especies de *Leishmania*, que pasa parte de su vida ciclo de vida en las moscas de la arena flebotomínicas que son los vectores para la transmisión a los hospederos vertebrados, son también ejemplos ilustrativos. La mosca de la arena al alimentarse de la sangre de un hospedero infectado, los amastigotes ingeridos maduran a promastigotes, que se adhieren al epitelio intestinal del insecto para evitar su excreción y poder dividirse varias veces antes de diferenciarse en los metacíclicos infecciosos que nadan libremente [69] (Fig. 6). Aunque se ha sospechado que el parásito LPG está involucrado, el receptor del intestino medio de la mosca de la arena *Phlebotomus papatasi* específico para el procíclico LPG *L. Major*, se identificó como una galectina (PpGalec) de repetición en tándem de 35.4kDa que sólo se expresa por las células del epitelio del intestino medio y es regulada de forma positiva en las hembras que se alimentan de sangre [70]. Debido a que la especificidad de unión de PpGalec está restringida a *Leishmania* promastigotes que acarrea cadenas laterales de poly-Gal(β 1-3) en su LPG, se propuso que la fracción de carbohidrato responsable de la unión específica de *L. major* al epitelio del intestino medio de *P. papatasi*. El ensamblaje de los epítopes de poligalactosa es regulado negativamente durante la metaciclogénesis de *L. major* y, así, incapaces de unirse a rPpGalec. Los promastigotes metacíclicos infecciosos que nadan libremente, son liberados del intestino medio para su transmisión desde la mosca de la arena al hospedero mamífero (Fig. 7) [70]. El parásito

protozoo *Perkinsus marinus* es un parásito intracelular facultativo que causa “Dermo” lesiones en la ostra oriental *Crassostrea virginica* y es responsable de los daños catastróficos al medio ambiente de ciertas especies en Norteamérica [71]. EL mecanismo de infección está por aclararse.

FIG. 5

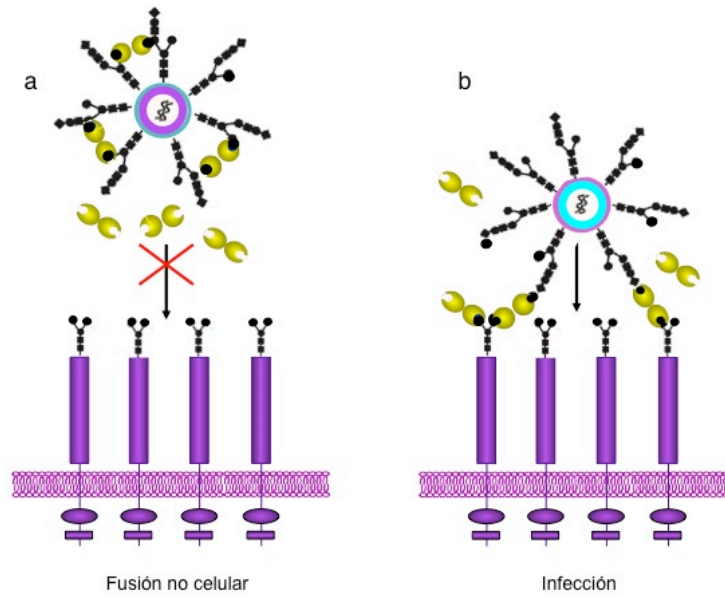


FIG. 6

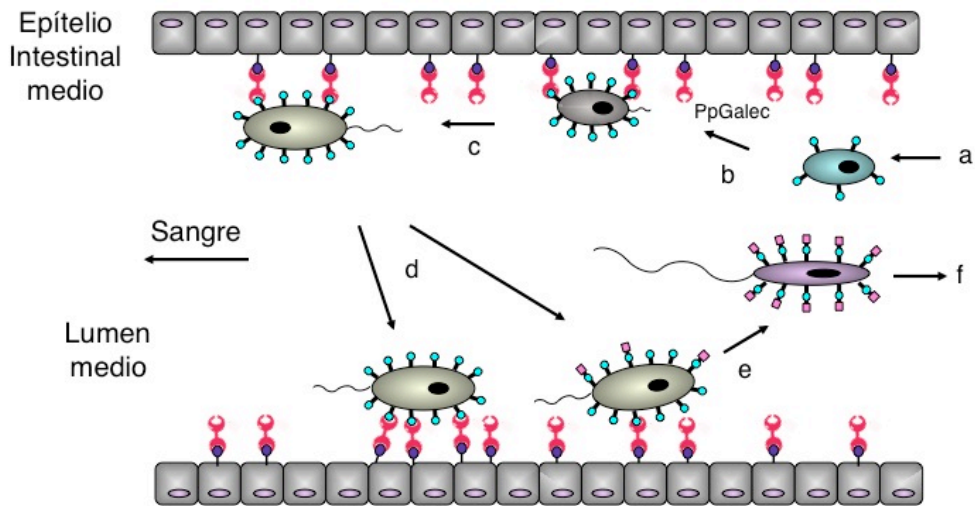
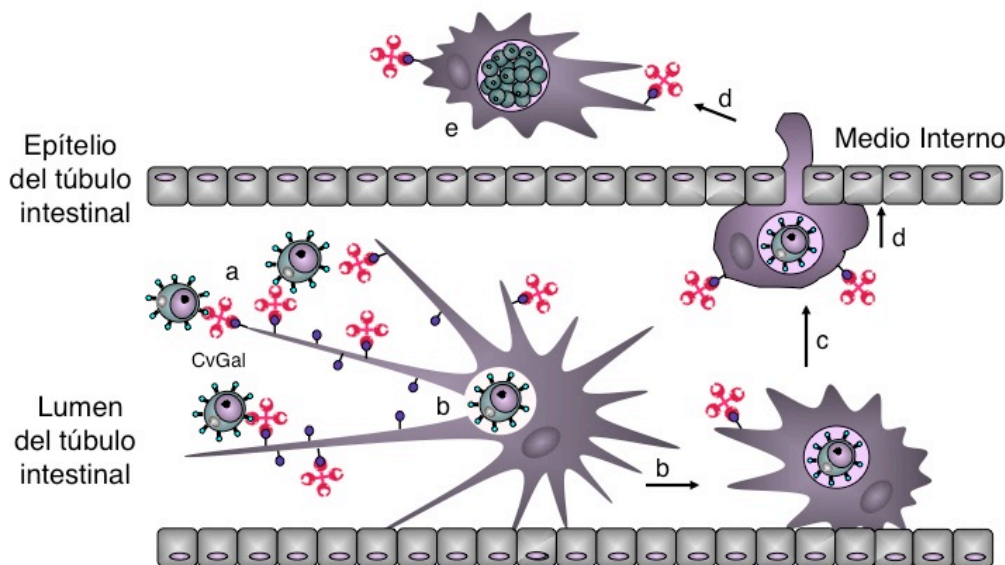


FIG. 7



Conclusiones

Estudios recientes indican claramente que las galectinas pueden funcionar como RRP que tienen como blanco a los oligosacáridos que contienen lactosamina en la superficie de virus, bacterias, protistas, patógenos helmintos y parásitos. Surge una extraña paradoja por el hecho de que las galectinas también reconocen a los glicanos que contienen lactosamina en la superficie de las células del hospedero para el desarrollo y la regulación de la homeostasis inmune. De acuerdo con el modelo de Janeway y Medzhitov [74] para el reconocimiento no autólogo, los RRP reconocen a los patógenos a través de las moléculas de superficie microbianas conservadas tales como las LPS o los peptidoglicanos (patrones moleculares asociados a patógenos; PAMPs), que están ausentes en el hospedero. Por lo tanto, esto no debería aplicarse a las galectinas rigurosamente, las cuales aparentemente unen el mismo patrón molecular propio/no propio. Esta paradoja subraya, en primer lugar, una sobre simplificación en el uso de la terminología RRP/PAMP, que aunque ha sido útil y se emplea extensamente, se debe utilizar con precaución. En segundo lugar, y más importante aún, revela las brechas importantes en nuestro conocimiento de la verdadera diversidad en el reconocimiento del repertorio de galectinas del hospedero y de los aspectos dinámicos y mecánicos de la compartimentalización celular y la secreción de sus componentes, así como de los aspectos estructurales y biofísicos de sus interacciones con las fracciones de carbohidratos de los microbios. Los glicomas del hospedero y del microbio y sus receptores evolucionan continuamente para escapar a su reconocimiento mutuo, un proceso conocido como el “efecto de la Reina Roja” [75], mediante el cual el microbio evita ser reconocido por los receptores del sistema inmune innato del hospedero (RRP), y por los factores de colonización del microbio (aglutininas, adhesinas y lectinas). Dados los papeles clave jugados por las galectinas en el desarrollo del hospedero y en la inmunoregulación mediante el reconocimiento de las fracciones de lactosamina “propias”, las galectinas no deberían evolucionar en su especificidad por determinados carbohidratos, lo que es apoyado parcialmente por la aparente conservación estructural dentro de la familia de las lectinas. Además, con la evidencia actual acerca de cómo los patógenos y los parásitos, que muestran una plasticidad evolutiva remarcada, subvierten efectivamente los papeles de las galectinas para adherirse o lograr entrar a las células del

hospedero, parece posible que en vez de evitar el reconocimiento por el hospedero hubieran evolucionado sus glicomas para imitar a los del hospedero en un modelo de “caballo de Troya” [72] y confiar en las moléculas de reconocimiento propias del hospedero tales como las galectinas para unirse al vector o para la invasión del hospedero. Es digno de notarse que la mayoría, si no todos, de los patógenos y parásitos están dotados de mecanismo diversos y poderosos para evadir el asesinato intracelular por el hospedero o la regulación negativa por las respuestas inmunes de corriente abajo. Las estrategias complejas desarrolladas por los microbios patógenos para colonizar, entrar, proliferar y diseminarse exitosamente dentro y entre sus vectores u hospederos son producto de las fuertes presiones selectivas que han conducido a las adaptaciones, que aseguran su supervivencia en los ambiente más hostiles, representando así un desafío significativo para el desarrollo de nuevas estrategias para la intervención en enfermedades humanas.

Agradecimientos

La investigación en el laboratorio de los autores revisada aquí fue apoyada por el presupuesto R01 GM070589 de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y los apoyos IOB-0618409 y IOS0822257 de la Fundación Nacional de Ciencias (NSF). La construcción de los modelos estructurales en la Figura 3 por el Dr. Mario Bianchet, Dept. of Biophysics and Biophysical Chemistry, Johns Hopkins University School of Medicine, se reconoce con agradecimiento. Así como el apoyo del Dr. José Luis Pérez García para la traducción al español de este manuscrito.

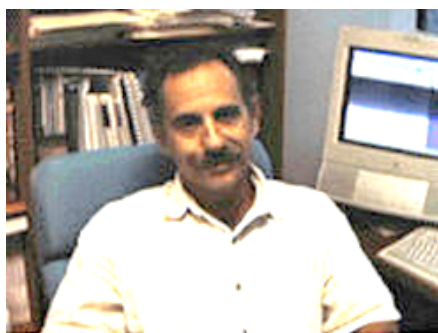
Referencias

1. Laine, R.A. (1997) En *Glycosciences: status and perspectives* (Gabijs, H.-J. & Gabijs, S., eds.) pp. 5-14, Chapman & Hill, Weinheim
2. Cooper, D.N. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 209-231
3. Vasta, G.R., Quesenberry, M., Ahmed, H. y O'Leary, N. (1999) *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 401-420
4. Hirabayashi, J. y Kasai, K. (1993) *Glycobiology* **3**, 297-304
5. Tasumi, S. y Vasta, G.R. (2007). *J. Immunol.* **179**, 3086-3098
6. Colnot, C., Ripoche, M., Fowles, D., Cannon, V., Scaerou, F., Cooper, D.N.W. y Poirier, F. (1997). *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **9**, 31-40
7. Rabinovich, G.A., Rubinstein, N. y Toscano, M.A. (2002) *Biochim Biophys. Acta* **1572**, 274-284
8. Cho, M. y Cummings, R.D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5207-5212
9. Patterson, R.J., Dagher, S.F., Vyakarnam, A. y Wang, J.L. (1997) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **9**, 77-85
10. Sato, S. y Hughes, R.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4424-4430
11. Cleves, A.E., Cooper, D.N.W., Barondes, S.H. y Kelly, RB. (1996) *J. Cell Biol.* **133**, 1017-1026
12. Liao, D.I., Kapadia, G., Ahmed, H., Vasta, G.R. y Herzberg, O. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 1428-1432
13. Bianchet, M.A., Ahmed, H., Vasta, G.R. y Amzel, L.M. (2000) *Proteins* **40**, 378-388
14. Lipkowitz, M.S., Leal-Pinto, E., Cohen, B.E. y Abramson, R.G. (2004) *Glycoconj. J.* **19**, 491-498
15. Gorski, J.P., Liu, F.T., Artigues, A., Castagna, L.F. y Osdoby, P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 18840-18848
16. Saouros, S., Edwards-Jones, B., Reiss, M., Sawmynaden K., Cota, E., Simpson, P., Dowse, T.J., Jäkke, U., Ramboarina, S., Shivarattan, T., Matthews, S. y Soldati-Favre, D. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 38583-38591
17. Walser, P.J., Kües, U., Aebi, M. y Künzler, M. (2005) *Fungal Genet. Biol.* **42**, 293-305

18. Stalz, H., Roth, U., Schleuder, D., Macht, M., Haebel, S., Strupat, K., Peter-Katalinic, J. y Hanisch, F.G. (2006) *Glycobiology* **16**, 402-414
19. Ogden, A.T., Nunes, I., Ko, K., Wu, S., Hines, C.S., Wang, A.F., Hegde, R.S. y Lang, R.A. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 28889-28896
20. Ahmed, H. y Vasta, G.R. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**, 350-355
21. Houzelstein, D., Gonçalves, I.R., Fadden, A.J., Sidhu, S.S., Cooper, D.N., Drickamer, K., Leffler, H. y Poirier, F. (2004) *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1177-1187
22. Dam, T.K. y Brewer, C.F. (2008) Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptor interactions. *Biochemistry* **47**, 8470-8476
23. Schwarz, F., Ahmed, H., Bianchet, M.A., Amzel, L.M. y Vasta, G.R. (1998) *Biochemistry* **37**, 5867-5877
24. Ahmed, H. y Vasta, G.R. (1994) *Glycobiology* **4**, 545-549
25. Lobsanov, Y.D., Gitt, M.A., Leffler, H., Barondes, S.H. y Rini, J.M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 27034-27038
26. Seetharaman, J., Kanisberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Barondes, S.H., y Rini, J.M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 13047-13052
27. Sparrow, C.P., Leffler, H. y Barondes, S.H. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 7383-7390
28. Sato, S. y Hughes, R.C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6983-6990
29. Ahmed, H., Bianchet, M.A., Amzel, L.M., Hirabayashi, J., Kasai, K., Giga-Hama, Y., Tohda, H. y Vasta, G.R. (2002) *Glycobiology* **12**, 451-461
30. Shoji, H., Nishi, N., Hirashima, M. y Nakamura, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 12285-12293
31. Zhou, Q. y Cummings, R.D. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **281**, 27-35
32. Fang, R., Mantle, M. y Ceri, H. (1993) *Biochem. J.* **293**, 867-72
33. Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., y Poirier, F. (2004) *Glycoconj. J.* **19**, 433-440
34. Yang, R. Y., Rabinovich, G. A. y Liu, F. T. (2008) *Expert Rev. Mol. Med.* **10**:e17
35. Sato, S. y Nieminen, J. (2004) *Glycoconj. J.* **19**, 583-591
36. Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., Jackson, S.S. y Vasta, G.R. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 513-520
37. Brewer, C.F., Miceli, M.C. y Baum, L.G. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 616-623
38. Partridge, E.A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G.M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I.R., Wrana, J.L. y Dennis, J.W. (2004) *Science* **306**, 120-124
39. Morris, S., Ahmad, N., Andre, S., Kaltner, H., Gabius, H.J., Brenowitz, M. y Brewer, F. (2004) *Glycobiology* **14**, 293-300
40. Dam, T.K. y Brewer, C.F. (2008) *Biochemistry* **47**, 8470-8476
41. Brewer, C.F., Miceli, M.C. y Baum, L.G. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 616-623
42. Cooper, D.N., Massa, S.M. y Barondes, S.H. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 1437-1448
43. Watt, D. J., Jones, G. E. y Goldring, K.. (2004) *Glycoconj. J.* **19**, 615-619
44. Georgiadis, V., Stewart, H.J., Pollard, H.J., Tavsanoğlu, Y., Prasad, R., Horwood, J., Deltour, L., Goldring, K., Poirier, F. y Lawrence-Watt, D.J. (2007) *Dev. Dyn.* **236**, 1014-1024
45. Fowlis, D., Colnot, C., Ripoche, M.A. y Poirier, F. (1995) *Dev. Dyn.* **203**, 241-51
46. Colnot, C., Fowlis, D., Ripoche, M., Bouchaert, I. y Poirier, F. (1998) *Dev. Dyn.* **211**, 306-13
47. Puche, A.C., Poirier, F., Hair, M., Barlett, P.F. y Key, B. (1996) *Dev. Biol.* **179**, 274-87
48. Colnot, C., Sidhu, S.S., Balmain, N. y Poirier, F. (2001) *Dev. Biol.* **229**, 203-214
49. Pace, K.E., Lebestky, T., Hummel, T., Arnoux, P., Kwan, K. y Baum, L.G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13091-13098
50. Ahmed, H., Du, S.J., O'Leary, N. y Vasta, G.R. (2004) *Glycobiology* **14**, 219-32
51. Vasta, G.R. (2009) *Nature Reviews Microbiol.* **7**:424-438.
52. Rabinovich, G.A., Rubinstein, N. y Toscano, M.A. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 274-284
53. van Die I, Cummings RD. (2010) *Glycobiology*. **20**: 2-12.
54. Vasta, G.R., Quesenberry, M., Ahmed, H. y O'Leary, N. (1999) *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 401-420
55. Dias-Baruffi M, Stowell SR, Song SC, Arthur CM, Cho M, Rodrigues LC, Montes MA, Rossi MA, James JA, McEver RP, Cummings RD. 2010 (En proceso de publicacion)

56. Stowell, S.R., Qian, Y., Karmakar, S., Koyama, N.S., Dias-Baruffi, M., Leffler, H., McEver, R.P. y Cummings, R.D. (2008) *J. Immunol.* **180**, 3091-3102
57. Rabinovich, G.A., Liu, F.T., Hirashima, M. y Anderson, A. (2007) *Scand. J. Immunol.* **66**, 143-158
58. Stowell, S.R., Karmakar, S., Stowell, C.J., Dias-Baruffi, M., McEver, R.P. y Cummings, R.D. (2007) *Blood* **109**, 219-227
59. Zúñiga, E., Gruppi, A., Hirabayashi, J. Kasai, K.I. y Rabinovich, G.A. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 6804-6012
60. Liu, F.T. y Hsu, D.K. (2007) *Drug News Perspect.* **20**, 455-60
61. Hirashima, M., Kashio, Y., Nishi, N., Yamauchi, A., Imaizumi, T.A., Kageshita, T., Saita, N. y Nakamura, T. (2004) *Glycoconj J.* **19**, 593-600
62. Rossi, B., Espeli, M., Schiff, C. y Gauthier, L. (2006) *J. Immunol.* **177**, 796-803
63. Yang, R.Y., Rabinovich, G. A. y Liu, F.T. (2008) *Expert. Rev. Mol. Med.* **10**:e17
64. Ouellet, M., Mercier, S., Pelletier, I., Bounou, S., Roy J., Hirabayashi, J., Sato, S. y Tremblay, M.J. (2005) *J. Immunol.* **174**, 4120-4126
65. Mercier, S., St-Pierre, C., Pelletier, I., Ouellet, M., Tremblay, M.J., y Sato, S. (2008) *Virology* **371**, 121-129
66. Fogel, S., Guittaut, M., Legrand, A., Monsigny, M. y Hébert, E. (1999) *Glycobiology* **9**, 383-387
67. Schröder, H.C., Ushijima, H., Theis C., Seve, A.P., Hubert, J. y Müller, W.E. (1995) *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **9**, 340-348
68. Hsu, D.K., Hammes, S.R., Kuwabara, I., Greene, W.C. & Liu, F.T. (1996) *Am. J. Pathol.* **148**, 1661-1670
69. Kamhawi, S. (2006) *Trends Parasitol.* **22**, 439-445
70. Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V.M., Kumar, S., Lawyer, P.G., Turco, S.J., Barillas-Mury, C., Sacks, D.L. y Valenzuela, J.G. (2004) *Cell.* **119**, 329-341
71. Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D.M.E., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W. y Vasta, G.R. (1999) *Science* **285**, 1505-1510
72. Tasumi, S. y Vasta, G.R. (2007) *J. Immunol.* **179**, 3086-3098
73. Okumura, C.Y., Baum, L.G. y Johnson, P.J. (2008) *Cell Microbiol.* **1**, 2078-2090
74. Medzhitov, R. y Janeway, C.A. Jr. (2002) *Science* **296**, 298-300
75. Varki, A. (2006) *Cell* **126**, 841-845

Semblanza del Dr. Gerardo R. Vasta



Gerardo Raúl Vasta. Originario de Buenos Aires, Argentina, realizó las licenciaturas en Zoología y en Bioquímica y posteriormente obtuvo el Doctorado en Bioquímica por La Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina (1978), así como el Doctorado en Bioquímica en la misma Universidad en 1980. Desde 1997 es Profesor del Centro de Biotecnología Marina, de la Universidad de Maryland, Baltimore, MD, Estados Unidos. También es Investigador del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad George Washington Washington, DC., desde 1996. Ha sido merecedor de diversos premios a su labor científica tanto

en Argentina como en Estados Unidos. Su línea de investigación está dirigida a identificar los aspectos moleculares, bioquímicos y biológicos de la interacción proteína-carbohidrato en la inmunidad innata. Ha sido revisor de diversas revistas científicas de difusión internacional como el *Journal of Biological Chemistry*, *Biochemistry*, *Glycobiology* entre otras y Editor de Revistas como *Journal of Experimental Zoology*, *Fish and Shellfish Immunology*, autor de más de 100 artículos en su especialidad.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 31-42. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

LA GENÉTICA DE POBLACIONES PREHISPÁNICAS MEXICANAS Y SU IMPORTANCIA

María de Lourdes Muñoz¹, Gerardo Pérez-Ramírez¹, Álvaro Díaz-Badillo¹, y
María Concepción Morales Gómez²

¹Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508 Col. San Pedro Zacatenco, 07360, México D.F., México

²Universidad Tecnológica de Tecamac, Edo. México, México
lmunoz@cinvestav.mx

Resumen

La mayor parte del material genético que se encuentra en una célula está en el núcleo y una pequeña parte esta en las mitocondrias. Las mitocondrias poseen su propio material genético con la particularidad de que sólo se transmite por vía materna. Por sus características, el material genético mitocondrial ha brindado información muy valiosa sobre la evolución del hombre y sus migraciones. Asimismo, su análisis con técnicas de biología molecular y bioinformática ha apoyado el desarrollo de nuevas disciplinas tales como la Antropología Molecular. A esta disciplina compete el estudio de las relaciones que guardan los individuos entre si, o entre poblaciones de distintos lugares y entre las poblaciones a través del tiempo. En la actualidad el estudio del DNA mitocondrial ha permitido clasificar a las poblaciones de todo el mundo en grupos diferenciados entre sí por los cambios en sus secuencias conocidos como haplotipos. En nuestro laboratorio se han obtenido DNA de muestras de restos óseos de diferentes sitios arqueológicos de todo el país, datados en diferentes periodos prehispánicos; de los cuales hemos obtenido la secuencia de la región hipervariable I del DNA mitocondrial, para conocer su haplotipo. Los resultados hasta la fecha nos muestra que el 86% de los individuos estudiados son haplotipo A y el 14% son haplotipo D. Es importante mencionar que también estamos haciendo estudios en poblaciones contemporáneas para establecer las relaciones que existen entre estas y las prehispánicas. Asimismo, los estudios de la estructuración poblacional mestiza contemporánea y prehispánica nos permitirá conocer nuestro pasado, la herencia que nos dejaron nuestros antepasados en cuanto a la susceptibilidad a ciertas enfermedades, nuestro origen y las migraciones.

Palabras clave: Poblaciones humanas, migración, DNA mitocondrial, haplotipo, restos óseos antiguos.

Abstract

Most of the genetic material is found in the nucleus of the cell and a little quantity is in the mitochondria. Nevertheless the mitochondria possess its own genetic material with the particularity that is inherited directly by the mother. Mitochondrial DNA studies have contributed significantly to the knowledge of human evolution and migration, due to its specific characteristics; furthermore its analysis by techniques of molecular biology and bioinformatics has supported the development of new disciplines such as the Molecular Anthropology. This discipline concerned with the study of the relationship among individuals or between populations of different geographic areas and among populations through the time. Currently the study of the mitochondrial DNA has allowed the classification of the populations in the entire world in groups differentiated by the changes in the sequences known as haplotypes. In our laboratory the DNA has been obtained from bone samples of different archaeological sites in Mexico dated at diverse prehispanic periods. The sequences of the hypervariable region I of the mitochondrial DNA have been obtained and analyzed to determine the haplotype. Results showed that 86% of the individuals have haplotype A, and 14% haplotype D. It is important to mention, that we are also doing studies in contemporary populations to establish the relationships between them and the prehispanic populations. In addition, population structure studies of both the prehispanic and contemporary population, will allow us to know our past and the inheritance of our ancestors, the susceptibility to certain illnesses, our origin and migrations in the past and present time.

Keywords: Human populations, migration, mitochondrial DNA, haplotype, ancient bone remains.

Introducción

A través de la historia, los arqueólogos y los antropólogos físicos han estudiado a nuestros ancestros mediante el análisis de restos óseos, con el propósito de aumentar el conocimiento acerca de la evolución biológica y de la civilización humana así como del poblamiento mundial [1,2]. Ahora ambas disciplinas se han asociado con la Biología Molecular para dar origen a la denominada Antropología Molecular [3].

En especial el estudio del DNA mitocondrial (mtDNA) ha hecho grandes aportes al conocimiento de la evolución humana durante los últimos años [4]. Posee características que lo han convertido en una herramienta útil para investigar la relación del hombre con el resto de los primates mediante análisis filogenéticos, así como las migraciones del hombre.

El estudio del mtDNA también puede ayudar a respaldar hipótesis de los pobladores del pasado remoto, por ejemplo, para correlacionar si haplotipos específicos son característicos de alguna clase social; determinar a qué poblaciones pertenecieron los restos óseos de personas que fueron víctimas del sacrificio; establecer si diferentes etapas culturales representan una importación de culturas diferentes o el desplazamiento de una población de una cultura por otra, etc. [5,6].

El DNA antiguo

El DNA obtenido de restos antiguos se le conoce como DNA antiguo [7] y proporciona información variada que puede ser aplicada a muchos campos de la ciencia como por ejemplo la genética de poblaciones, la medicina forense, la antropología física, la taxonomía evolutiva y la arqueología. Ésta se ha usado también, para determinar distancias biológicas, enfermedades y parentesco en poblaciones humanas. Asimismo, ofrece la posibilidad de establecer las características fenotípicas de muestras muy fragmentadas; la determinación del sexo cuando los huesos del esqueleto en estudio están muy deteriorados ya que éste se diagnostica comúnmente mediante morfoscopia y osteometría [1,3,8,9,10].

El primer estudio de DNA antiguo se realizó con muestras de piel del cuagga, especie de la familia de los équidos que vivió en África del Sur. El estudio de las secuencias del mtDNA indicó que el cuagga tenía un estrecho parentesco con estos équidos [11].

El DNA antiguo se ha extraído hasta ahora de múltiples tejidos. Por ejemplo de restos congelados, que es donde el DNA se encuentra mejor conservado. Un ejemplo es el DNA purificado y caracterizado del músculo de Mamut con una antigüedad de 40,000 años [12]. Los restos hallados en pantanos donde se recuperó y secuenció mtDNA de un cerebro humano con una antigüedad de 8,000 años [13] es otro ejemplo típico. En huesos humanos se ha aislado DNA de restos de 650 años de antigüedad; y se ha logrado la amplificación del mtDNA de material óseo de 5,400 años de antigüedad.

El análisis del DNA de muestras antiguas es complicado ya que éste se encuentra degradado y fragmentado [14,15,16], además de que pueden existir varias fuentes de contaminación de DNA exógeno, que pueden alterar el resultado por lo que es indispensable analizar junto con las muestras, el DNA de los trabajadores (arqueólogos, antropólogos, biólogos, etc.) para discriminar falsos positivos, así como tener áreas de trabajo controladas y material estéril [17,18,19]. Otro tipo de contaminación son compuestos del subsuelo de los sitios de excavación que inhiben la reacción de la polimerasa.

El DNA mitocondrial y los haplogrupos

La mitocondria es un organelo celular que posee DNA propio que codifica para diferentes subunidades de proteínas involucradas en la cadena respiratoria. El DNA de las mitocondrias es una molécula circular de 16,569 pares de bases (pb) que codifica para rRNA 12S y 16S, 22 tRNAs y 13 proteínas. Asimismo, contiene una región hipervariable no-codificante [20,21,22].

El mtDNA tiene características que lo hacen útil para estudios de genética de poblaciones y evolución. Entre éstas se encuentran su herencia por vía materna (lo que permite hacer un estudio de linaje retrospectivo). El mtDNA es una molécula multicopia, hay de 1000 a 10 000 mitocondrias por célula, no sufre recombinación, por lo que la variación observada es el resultado de la adición de mutaciones a través del tiempo; tiene una tasa de mutación superior a la del DNA nuclear y finalmente posee sitios polimórficos estables en regiones codificantes que se han caracterizado y dieron origen a los llamados haplogrupos [22,23,24].

Los haplogrupos son familias de DNA mitocondrial que comparten una mutación dentro de una población. Un haplotipo es un segmento de DNA que se hereda como una unidad y por lo tanto no tiene recombinación. Dos DNA mitocondriales que pertenecen a un mismo haplogrupo se pueden distinguir el uno del otro por mutaciones adicionales que pertenecen a haplotipos distintos [1,22].

Los haplogrupos son específicos para algunas poblaciones y regiones geográficas, lo que ha permitido establecer relaciones entre poblaciones antiguas y contemporáneas, así como entre diferentes poblaciones antiguas y entre poblaciones contemporáneas [6].

Los haplogrupos específicos para las poblaciones del continente Americano son los llamados A, B, C y D. El haplotipo A se caracteriza por la ganancia de un sitio de restricción para la enzima *HaeIII* en el nucleótido (nt) 663; el haplotipo B, por la supresión de 9 pb en el nt 8,272; el haplotipo C por la ganancia del sitio de restricción *AluI* en el nt 13,262 y pérdida de un sitio *HincII* en el nt 13,259; el haplotipo D se caracteriza por la pérdida de sitio *AluI* en el nt 5,176 [6,23,25].

También existen mutaciones específicas en la región denominada D-loop que corresponden a cada haplogrupo. El haplogrupo A se identifica por 2 cambios, uno en la posición 16,290 de C→T y el otro en la posición 16,319 de G→A. El haplogrupo B se caracteriza por el cambio de T→C en las posiciones 16,189, 16,217 y 16,519. El haplogrupo C se identifica por los 2 cambios de T→C en la posición 16,298 y C→T en la posición 16,327. Finalmente el haplogrupo D se caracteriza por los cambios T→C en el nt 16,325 y T→C en el nt 16,362 [8,26,27,28].

El DNA Mitocondrial y las migraciones

El estudio del mtDNA ha permitido determinar que todos los linajes maternos actuales provienen de la llamada "Eva africana". El haplotipo más antiguo corresponde al haplotipo L1, originado en África hace más de 130,000 años y se encuentra restringido a ese continente. Mediante estudios filogenéticos se ha sugerido que hace aproximadamente 60,000-80,000 años, hubo una expansión de los habitantes con los haplotipos L2 y L3 que provocó la migración "fuera de África" hacia las áreas de Arabia y el Mar Mediterráneo. Todos los haplogrupos actuales son descendientes del haplotipo L3, el cual dio origen a los haplogrupos M y N; posteriormente se dieron migraciones hacia diferentes rutas: Australia, Papua Nueva Guinea y Asia. En el periodo fechado hace aproximadamente de 60,000-30,000 años los haplotipos M y N mutaron para dar origen a los haplogrupos fundadores A, B, F y D [29].

La teoría más aceptada es que la entrada del hombre a América fue de Asia, a través del estrecho de Bering, aunque existen varias hipótesis acerca de las migraciones realizadas para habitar el continente Americano; así como de las características genéticas y culturales de los primeros pobladores de América. Una de las propuestas sobre el poblamiento sugiere tres migraciones del noreste de Asia durante el Pleistoceno tardío. Los integrantes de la primera oleada y algunos de la segunda oleada dieron origen a los Amerindios del sur, norte y centro-América, la mayor parte de la segunda oleada dieron origen a los Indígenas Na-Dene de Alaska y costa del Pacífico norte y la tercera oleada a los Eskimo y Aleut [23,26,30,31]. Los primeros estudios del mtDNA en nativos americanos sugieren que tienen relación con poblaciones mongoloides asiáticas [6,26,32].

Los estudios sobre mtDNA de poblaciones prehispánicas de México han sido realmente muy pocos. Los primeros estudios en México sobre DNA antiguo versaron sobre la purificación de DNA de restos óseos antiguos del sitio arqueológico de Monte Albán, Oaxaca [2]. Los haplogrupos de estos restos óseos, de la cultura zapoteca, pertenecientes a los años 500 a.C y 800 d.C. correspondieron al haplogrupo A [33]. El análisis de restos óseos de 25 individuos de los periodos Post-clásico y Clásico tardío, pertenecientes al sitio de Xcaret, Quintana Roo, mostró que el 48% pertenecieron al haplogrupo A, el 4% al B y el 8% al C [34]. De 34 muestras de pobladores prehispánicos de Cholula del Clásico y Posclásico mesoamericanos fue posible extraer el mtDNA de 10 muestras, de las cuales 9 correspondieron al haplogrupo A [26].

Historia de las Poblaciones Humanas Prehispánicas

Las sociedades humanas constituyen entidades dinámicas tanto en sentido sincrónico como cronológico, pues establecen relaciones entre sí por razones económicas, políticas, religiosas y biológicas, refiriéndonos a las genéticas.

Las poblaciones humanas que, por primera vez, ocuparon el hoy territorio de la República Mexicana dentro del marco de la evolución humana, pertenecieron a la especie *Homo sapiens sapiens*. Vestigios arqueológicos de su actividad en territorio nacional datan de alrededor de hace 40,000 años y restos de sus osamentas datan de aproximadamente 30,000 años, como por ejemplo el llamado "Hombre del Metro", localizado durante la construcción de la estación Balderas de dicho servicio de transporte público en el año de 1968.

Las poblaciones eran nómadas y con una subsistencia que dependía exclusivamente de los recursos naturales que tomaban del medio ambiente, conocidos como cazadores-recolectores. Los grupos eran pequeños de entre 15 y 20 personas y se encontraban dispersos según lo permitiera la abundancia de los alimentos. Este tipo de subsistencia perduró aproximadamente del 40,000 al 7,000 a. C., periodo conocido como Paleolítico.

Un cambio crucial tanto en la subsistencia como en la organización social fue consecuencia de la incipiente agricultura, evidencia que quedó registrada en abrigos rocosos del estado de Puebla, y la subsecuente domesticación de cultivos como el maíz, calabaza aguacate, chile y frijol. Este proceso tomó cerca de 5,000 años. Las poblaciones entonces fueron sedentarias y pudieron albergar mayor número de personas.

Estas primeras aldeas estaban dispersas entre sí, eran autosuficientes y su organización social era de carácter igualitario. Si bien ya eran agrícolas, los recursos obtenidos de la caza, pesca y recolección seguían siendo importantes para la subsistencia. Ejemplos de estas aldeas se encuentran en la costa del Pacífico de Chiapas, en el sur de Veracruz, en el Valle de Oaxaca y en el centro de México cerca de las zonas lacustres. Entre el 1,800-1,400 a.C. se observa una creciente complejidad social y económica de la vida aldeana ya que existen mayores contactos entre distintos grupos formándose redes primitivas de comercio a larga distancia en materias primas de uso básico como lo fue la obsidiana. Para este tiempo ya existen indicios de diferencias de estatus social al interior de las aldeas, es decir determinados individuos adquieren mayor importancia en virtud de sus conocimientos o habilidades.

La primer sociedad claramente estratificada de Mesoamérica fue la sociedad Olmeca que se desarrolla entre el 1,200-400 a. C. con centros como San Lorenzo, Laguna de los Cerros, Tres Zapotes y La Venta, en Veracruz y Tabasco. En la sociedad Olmeca se observa una marcada división del trabajo, por ejemplo, los artesanos especializados como los escultores y los que trabajaban el jade. La estratificación social de la sociedad quedó magistralmente plasmada en los monumentos de piedra conocidos como "tronos", pues representan el vínculo que existía entre los antepasados divinos y el gobernante. Estos monumentos constituyeron la justificación simbólica del derecho que tenían los miembros de determinado linaje a gobernar.

Los olmecas establecieron una red de comercio a larga distancia para procurarse recursos de los cuales no disponían localmente como lo fueron el jade, la serpentina, obsidiana, magnetita, ilmenita, que llegaban de Guerrero, Puebla, Oaxaca, Hidalgo y Guatemala. Debido a esto la cerámica y escultura Olmeca se comienzan a encontrar en sitios distantes de la Cuenca de México (Tlatilco), en la costa del Pacífico Chiapaneco, Oaxaca y Guerrero. En ocasiones los objetos forman parte de la ofrenda funeraria de individuos de las regiones mencionadas. Si bien los objetos pudieron haber llegado por medio de intercambio al considerárseles objetos de prestigio, no está cancelada la posibilidad de que individuos olmecas emigraran y eventualmente contribuyeran, en algún grado, al mestizaje de aquellas regiones.

Los sitios olmecas establecieron además una red de influencia regional en la que las capitales olmecas fungieron como centro rector (el corazón económico, político e ideológico) de otros sitios secundarios y aldeas contiguas. Diversas razones provocaron el paulatino declive de los centros olmecas, pero en cada caso la jerarquía de sitios en torno a cada capital en su momento se vio fracturada provocando el abandono de sitios y con ello el movimiento o migración de individuos a regiones circunvecinas.

Sin embargo, en las sociedades mesoamericanas los movimientos migratorios no sólo obedecieron a motivos culturales sino también en ocasiones a fenómenos naturales. Tal es el caso de lo sucedido en Cuicuilco, centro religioso del Periodo Preclásico Terminal localizado en el sur de la Cuenca de México. Este fue uno de los asentamientos más importantes del centro de México pues cubrió una extensión de aproximadamente 5 km cuadrados y su población habría alcanzado algunos miles de personas. Sin embargo entre el 200-100 a.C., este sitio fue despoblado a consecuencia de la erupción del volcán Xitle.

Sin duda uno de los sitios más importantes en la historia de Mesoamérica lo fue la ciudad de Teotihuacán (200 a.C.-800 d.C.) perteneciente al Periodo Clásico. La ciudad fue erigida en un lugar estratégico pues se hallaba en la ruta de acceso más directa entre la región de la Costa del Golfo y la Cuenca de México. Si bien otros factores influyeron también para elegir el lugar, por ejemplo los yacimientos de obsidiana y la presencia de manantiales.

Teotihuacán fue una urbe cosmopolita (pluriétnica) pues en sectores específicos de la ciudad habitó gente de origen oaxaqueño, de la Costa del Golfo y también del occidente. Esto se ha identificado gracias a la presencia de cerámica y a la práctica de costumbres funerarias propias de aquellas regiones. Además en el área maya en los sitios de Tikal y Kaminaljuyú, ambos en Guatemala, la cual se encontraba en su esplendor. También se han encontrado tumbas de individuos de la élite cuya ofrenda asociada incluye cerámica importada de Teotihuacán; lo que sugiere la posibilidad de que personas de la élite teotihuacana participaran de manera destacada en el gobierno de esos sitios, o que estableciera alianzas matrimoniales con la clase gobernante de otras regiones.

Dada su posición estratégica Teotihuacán fue el centro de una amplia red de intercambio en la Mesoamérica del Clásico, resaltando su importancia económica, política y religiosa. Para el momento de su apogeo (500 d.C.) la ciudad se extendía sobre una superficie de 20 km cuadrados y alcanzó una población de poco más de 100,000 personas. Los recintos de la nobleza estaban lujosamente decorados con pintura mural cargada de simbolismo político-religioso. La traza y simetría de la ciudad no tuvieron paralelo en el México antiguo así como las dimensiones de la arquitectura y los espacios públicos (plazas).

Teotihuacán constituyó un elemento de cohesión y punto de referencia para las poblaciones mesoamericanas. Sin embargo, diversos factores fueron paulatinamente minando su estabilidad e influencia que a la postre llevarían a su caída y colapso (700-900 d.C.). De los factores que influyeron se ha considerado el deterioro ecológico provocado por las dimensiones propias de la urbe, ya que las tareas de construcción que demandaban, incidieron negativamente en los bosques aledaños, provocando un clima menos húmedo con sequías más prolongadas y por ende el deterioro en el rendimiento agrícola; la competencia política de otros sitios; y por supuesto los conflictos políticos internos.

El colapso de Teotihuacán y su abandono tuvo grandes implicaciones sociales, ya que generó un reordenamiento político en el que intervinieron sitios como Xochicalco, Cacaxtla, Cholula, en el Altiplano Central, El Tajín en la Costa del Golfo y Monte Albán situado en el Valle de Oaxaca. La gran cantidad de población que alguna vez habitó la ciudad también sufrió un paulatino reacomodo demográfico impactando principalmente a los asentamientos que ya existían en la Cuenca de México y que formaban parte del área de influencia teotihuacana más

inmediata y se crean nuevos asentamientos en las inmediaciones de los lagos de Texcoco, Chalco y Xochimilco.

Todos estos eventos se sugieren basados en estudios realizados por los antropólogos y los arqueólogos. La descripción anterior forma parte del desarrollo de las sociedades del México prehispánico mostrándonos los fenómenos sociales y naturales que obligaron el movimiento de los individuos en la geografía del territorio Mexicano y sus implicaciones en el proceso de mestizaje. De ahí nace nuestro interés de estudiar en forma conjunta con las disciplinas antropológicas y de la genética, para tener un conocimiento más preciso de la historia de los pobladores del México antiguo y contemporáneo. Asimismo, estos estudios nos permitirán conocer las migraciones de las poblaciones y elucidar en el futuro los factores genéticos de susceptibilidad a enfermedades heredadas por nuestros ancestros indígenas.

Ahora, para conocer más acerca de las poblaciones prehispánicas mexicanas es necesario el estudio de la información genética del mtDNA en restos de poblaciones antiguas. Tenemos la fortuna de ser uno de los países con un alto número de restos humanos antiguos. Los antropólogos han registrado 25,000 sitios arqueológicos de los cuales solo 160 han sido explorados y solo 140 han sido abiertos al público.

Gracias a nuestra colaboración con los antropólogos y arqueólogos hemos tenido acceso a 20 muestras de restos óseos ubicados en el periodo precerámico del Distrito Federal, Estado de México y Puebla. Además, de 47 muestras de Monte Alban, 15 muestras de Teotihuacan, 4 muestras de Bonampak, 1 muestra de Palenque, 6 muestras del Templo Mayor, 20 muestras de sitios Olmecas; así como de dos muestras de momias, una de 2,000 años de antigüedad de la Sierra Gorda Queretana y la otra de la región Tarahumara (Figura 1, Tablas 1 y 2).

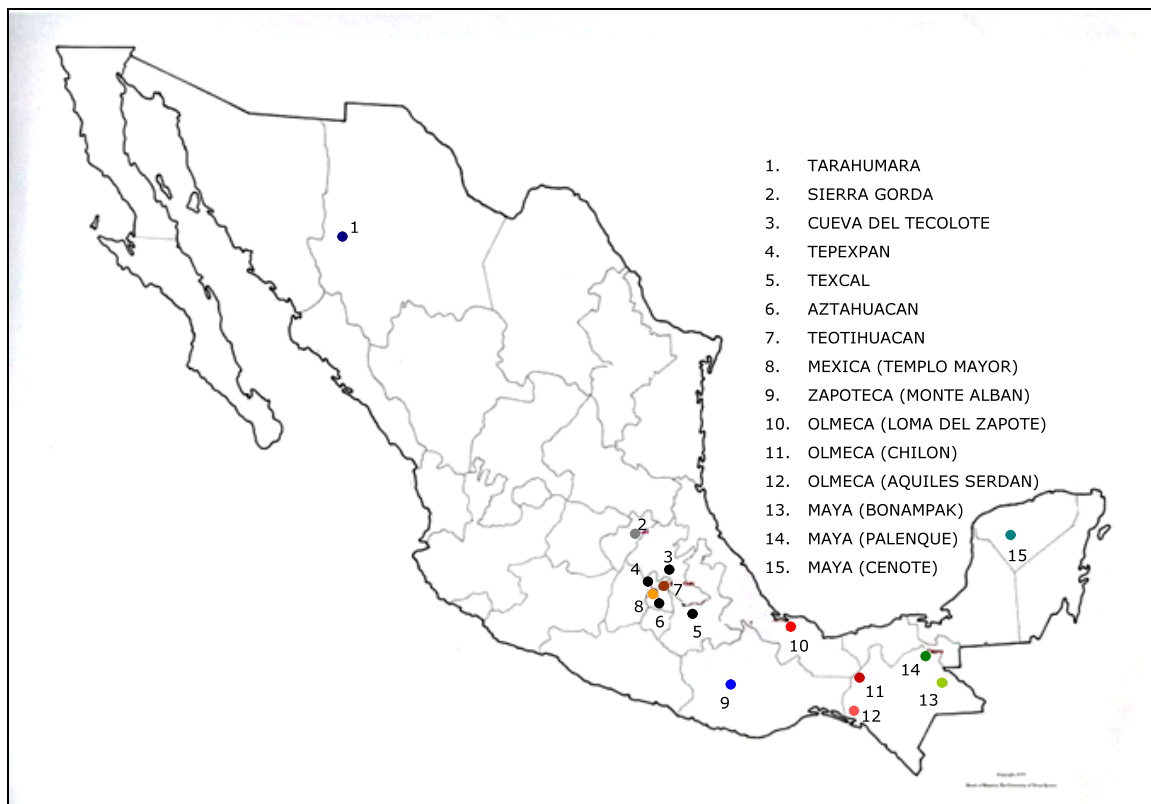


Figura 1. Mapa de localización de los sitios arqueológicos en estudio.

Tabla 1. Sitios arqueológicos. Descripción de los sitios de excavación.

Monte Albán	El clímax de la cultura Zapoteca fue entre los años 600-900 D.C. Los Mixtecos usaron las tumbas de los Zapotecos para sus entierros, cuando éstos abandonaron el sitio en la cima de la montaña.
Palenque	Fue una ciudad donde las piezas m piezas arquitectónicas fueron dedicadas a la religión. En 1940 se descubrió una escalera bajo el piso del clásico tardío del Templo de las Inscripciones. Encontraron una cripta que contenía una loza derrumbada.
Cenote, X-Batún, Umán, San Antonio Mulix	Los mayas asociaban los cenotes con los dioses de la lluvia llamados Chacs a los que les hacían sacrificios en su honor arrojando objetos y humanos.
Bonampak.	Un templo en este sitio contiene los mejores murales mayas conocidos. Pintados alrededor del año 800 y descubiertos en 1046, estos murales coloridos muestran el inicio y el final de una ceremonia muy elaborada.
Chilon, Aquiles Serdan y Loma del Zapote .	Población Olmecas que fue la más avanzada por sus logros culturales, con la mayor expansión geográfica. Influyo sobre las culturas de la zona maya, Oaxaca, el centro de México y el estado de Guerrero.
Tenochtitlan.	La capital mexicana, Tenochtitlán, fue fundada por los tenochcas en la primera mitad del siglo XIV (1325 o posiblemente 1345).
Teotihuacan	Fue la primera gran ciudad del Nuevo Mundo, centro de las fuerzas política y cultural más poderosas de Mesoamérica en el Período Clásico Temprano.
Toluquilla.	El punto culminante de la ciudad fue en la época Teotihuacana (100-200 D.C.). En los inicios del comercio Teotihuacano, donde hubo intercambio de cinabrio (tinte rojo, mercurio) por objetos Teotihuacanos (conchas, obsidiana, etc.).
Sierra Gorda, Altamira, Queretaro.	La momia, Pepita con 2300 años de edad, vestida con algodón y plumaje de cigüeña fue encontrada en 2002 en una cueva de Altamira, Querétaro.
Tarahumara,	Quienes habitaron el sur de Chihuahua pertenecía a la familia lingüística Yuto-nahua que originalmente ocupaban más de 28000 kilómetros cuadrados de terreno montañoso. Hoy en día, los Tarahumaras son un pueblo cuya riqueza espiritual e ideológica que les da una fuerte identidad cultural.

Hemos secuenciado la región hipervariable I de 40 muestras para conocer su haplotipo y para poder hacer estudios de migración de las poblaciones prehispánicas. De estas poblaciones hemos observado que el 86% pertenecen al haplotipo A y 14% son haplotipo D. En la Figura 2 observamos el estudio filogenético de 2 secuencias provenientes de muestras de Monte Albán. Estas dos muestras se agruparon en la rama del haplotipo D junto con secuencias contemporáneas de otros lugares del mundo. Para poder tener las relaciones entre las poblaciones prehispánicas con las contemporáneas también nos hemos dado a la tarea de estudiar las poblaciones contemporáneas mestizas mexicanas. Dentro de estas poblaciones hemos encontrado tanto los haplogrupos típicos del continente Americano A, B, C y D, así como algunos haplogrupos Europeos.

Tabla 2. Localización de las muestras de restos óseos antiguos en México.

Muestra	Localidad	Epoca	Edad
PRECERAMICO PEÑÓN DEL MÁRQUEZ E2	Distrito Federal	7000 a.C.	Adulto
PRECERAMICO PEÑÓN DEL MÁRQUEZ E1	Distrito Federal	7000 a.C.	Adulto
PRECERAMICO CUEVA DEL TECOLOTE	Hidalgo	7000-5000 a.C.	Adulto
PRECERAMICO STA MA ASTAHUACA E1	Distrito Federal	9000 a.C.	Adulto
PRECERAMICO STA MA ASTAHUACA E3	Distrito Federal	9000 a.C.	Adulto
PRECERAMICO CUEVA DEL TEXCAL	Puebla	5000-2500 a.C.	Adulto
OLMECA LOMA_ZAPOTE_22 ^a	Veracruz	1000-1200 a.C.	Adulto
OLMECA SAN_LORENZO_R-1	Veracruz	700-900 a.C.	Adulto
OLMECA AQUILES_SERDAN_59A	Chiapas	1200-1400 a.C.	Adulto
OLMECA CHILO_64A	Chiapas	1200-1400 a.C.	Adulto
OLMECA CHILO_66A	Chiapas	1200-1400 a.C.	Adulto
OLMECA CHILO_R-3	Chiapas	1200-1400 a.C.	Adulto
MEX_MON_ALBAN_E5L	Oaxaca	100 bc-650 a.C.	Adulto
MEX_MON_ALBAN_E21L	Oaxaca	100 bc-650 a.C.	Adulto
MEX_MON_ALBAN_T2L	Oaxaca	100 bc-650 a.C.	Adulto
MEX_MON_ALBAN_T2L	Oaxaca	100 bc-650 a.C.	Adulto
MEX_MON_ALBAN_T8	Oaxaca	100 ac- 250 a.C.	Adulto
MEX_MON_ALBAN_T7	Oaxaca	350 ac- 500 a.C.	Adulto
MEX_MON_ALBAN_E9L	Oaxaca	500 ac- 800 a.C.	Adulto
CENOTE MAYA	Chiapas	ND.	Adulto
MOMIA TARAHUMARA F9	Chihuahua	ND.	Adulto
BONAMPAK_E-1	Chiapas	580 ac-800 a.C.	Adulto
BONAMPAK_E-2	Chiapas	580 ac-800 a.C.	Adulto
BONAMPAK_E-3	Chiapas	580 ac-800 a.C.	Adulto
BONAMPAK_E-4	Chiapas	580 ac-800 a.C.	Adulto
MEX PEPITA SG MOMIA	Querétaro	500 ac	2.5
MEX_TEOTIHUACAN_M7T	México	800 ac-1100 a.C.	Adulto
MEX_TEOTIHUACAN_M20T	México	800 ac-1100 a.C.	Adulto
MEX_TEOTIHUACAN_M15T	México	800 ac-1100 a.C.	Adulto
MEX_TEOTIHUACAN_M5T	México	800 ac-1100 a.C.	Adulto
MEX_TEOTIHUACAN_M19AT	México	800 ac-1100 a.C.	Adulto
MEX_TEOTIHUACAN_M10T	México	800 ac-1100 a.C.	Adulto
MEX_TEOTIHUACAN_M11AT	México	800 ac-1100 a.C.	Adulto
MEX_TEMPLO_MAYOR_OF111N	Distrito Federal	1440 – 1460 d.C.	4-5
MEX_TEMPLO_MAYOR_OF111N	Distrito Federal	1440 – 1460 d.C.	4-5
MEX_TEMPLO_MAYOR_OF11_83B	Distrito Federal	1461 – 1481 d.C.	20-25
MEX_TEMPLO_MAYOR_OF11_83A	Distrito Federal	1461 – 1481 d.C.	20-25
MEX_TEMPLO_MAYOR_OF11_54	Distrito Federal	1461 – 1481 d.C.	20-25
MEX_TEMPLO_MAYOR_OF111	Distrito Federal	1502 – 1520 d.C.	4-5

Es primordial mencionar la importancia que tienen estos estudios ya que nos permitirán conocer con mayor precisión la migración de las poblaciones prehispánicas; haplogrupos que probablemente no se encuentran en las poblaciones contemporáneas debido a que se han perdido en el tiempo; y conocer a largo plazo la herencia que nos dejaron las poblaciones prehispánicas en referencia a la susceptibilidad a enfermedades. Esto será posible gracias a que además de estudiar al mtDNA también estamos realizando estudios del DNA Autosomal en colaboración con otros investigadores.

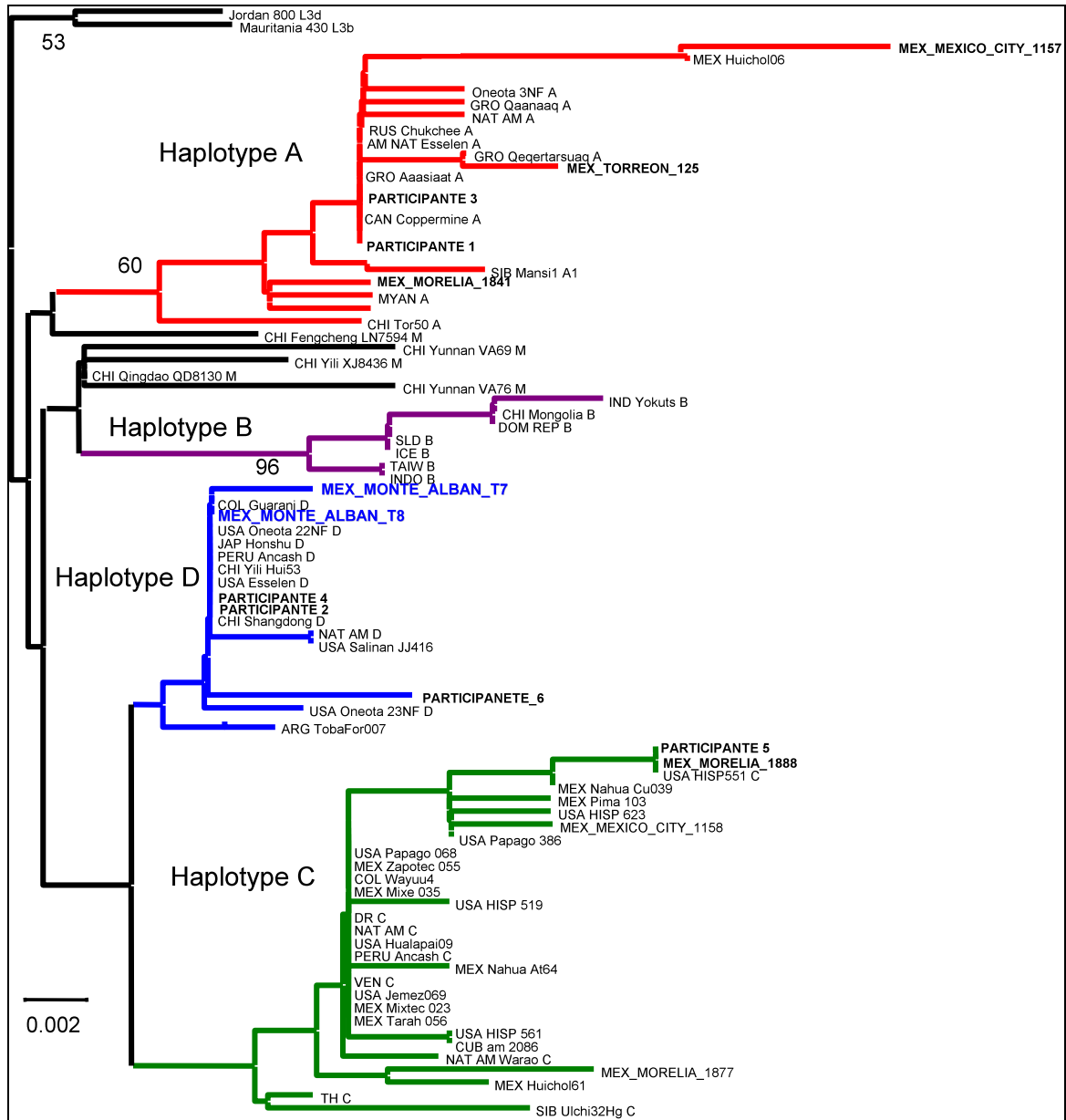


Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud. Se alinearon las secuencias de dos muestras de Monte Alban (MEX_MON_ALBAN_T8, MEX_MON_ALBAN_T7) con secuencias de individuos de otras poblaciones contemporáneas obtenidas del GenBank.

Agradecimientos

Estos estudios han sido apoyados por el Instituto de Ciencia y Tecnología del D.F. con número: MLMM-ICYT.

Referencias

1. Martínez, J. C. (2002) *J. Car. Ame. His. Ant.* 1-12
2. Muñoz, M. L., Moreno-Galeana, M., Díaz-Badillo, A., Loza-Martínez, I., Macías-Juárez, V. M., Márquez-Morfin, L., Jiménez-López, J. C. y Martínez-Meza, A. (2003) *Antropología y Diversidad*. Vol. 2, Ed. Bellaterra, España
3. Martínez, M. (2005) *Expresión Antropológica*. Nueva Época. **25**: 22-33
4. González, M. A. (2006) UAEH, Ed. *Sociedad y Pensamiento*. 77-104
5. Yu-qin, F. y Hong, Z. (2006) *Chem. Res. Chinese U.* **22**: 177-180
6. Merriwether, D. A., Rothhammer, F. y Ferrell, E. (1994) *Experientia* **50**: 592-601
7. Hofreiter M, Serre D. Poinar H. N. Kuch M. y Pääbo S. (2001) *Nat. Rev. Gen.* **2**: 353-359.
8. Juárez, A. (2002) *Tesis*. ENAH, México.
9. Faerman, M., Filon, D. y Oppenheim, A. (1995) *Gene* **167**: 327-332
10. Kashyap, V.K., Sanghamitra Sahoo, Sitalaximi, T. y Trivedi, R. (2006) *BMC Medical Genetics*. **7**:37
11. Higuchi, R., Bowman, B., Freiburger, M., Ryder, O.A. y Wilson, A.C. (1984) *Nature* **312**: 282-284
12. Jonhson, B.L., Weiler, J.T. y Camley, R.E. (1985). *Phys. Rev. B.* **32**: 6544–6553
13. Doran, G. H., Dickel, D. N., Ballinger, W. E., Agee, O. F. J., Lapaiz, P. J. y Hauswirth, W. W. (1986) *Nature* **322**: 803-806
14. Pääbo, S., Higuchi, R. y Wilson, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 9709-9712
15. Kalmar, T., Bacrati, C.Z., Marcsik, A. y Rasko, I. (2000) *Nucleic Acids Res.* **28**: E67
16. Rohland, N. y Hofritter, M. (2007) *BioTechniques* **42**: 343-352
17. Pruvost, M., Grange, T. y Geil, E. (2005) *BioTechniques* **38**: 569-575
18. Willerslev, E. y Cooper, A. (2005) *Proc. R. Soc. B.* **272**: 3-16
19. Schmidt, T., Hummel, S. y Herrmann, B. (1995) *Naturwissenschaften* **82**: 423-431
20. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. y Raff, M. (2004) *Biología Molecular de la Célula*. 4a Edición. Ed. Omega. Barcelona
21. Attimonelli, M., Accetturo, M. y Tommaseo-Ponzetta, M. (2005) *BMC Bioinformatics* **6**: (Suppl 4)
22. Eshleman, J., Malhi, R. y Smith, D. (2003) *Evo. Ant.* **12**: 7-18
23. Torroni, A. y Wallace, D. (1994) *Am. J. Human. Genet.* **54**: 303-318
24. Anderson, S, Bankier, A. T., Barrell, B. .G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. y Young, I. G. (1981) *Nature* **290**: 457-465
25. Stone, A. y Stoneking, M. (1998) *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 1153-1170
26. Horai, S., Kondo, R. y Tajima, K. (1993) *Mol. Biol. Evol.* **10**: 23-44
27. Torroni, A., Schurr, T. G. y Wallace, D.C. (1993) *Am. J. Hum. Genet.* **53**: 563-590
28. Stoneking, M. (2000) *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 1029-1032
29. Forster, P. (2004) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **359**: 255-264
30. Greenberg, J.H., Turner, C.G. y Zegura, S.L. (1986) *Curr. Anthropol.* **27**: 477-497.
31. Silva, W. A. Jr., Bonatto, S. L., Holanda, A. J., Ribeiro-dos-Santos, A. K., Paixao, B. M., Goldman, G. H., Abe-Sandes, K., Rodriguez-Delfin, L., Barbosa, M., Paco-Larson, M. L., Petzl-Erler, M. L., Valente, V. Santos, S. E. y Zago, M. A. (2002) *Am. J. Hum. Genet.* **71**: 187-192.
32. Ewen, C. (2008) *NewScientist* **19**: 01-29
33. Loza Martínez, I. (2000) *Tesis*. UNAM. México
34. González-Oliver, A., Márquez-Morfin, L., Jiménez, J. C. y Torre-Blanco, A. (2001) *Am. J. Phy. Ant.* **116**: 230-235.

Semblanza de la Dra. María de Lourdes Muñoz



La Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno recibió el grado de Ingeniera Bioquímica con Mención Honorífica en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Sus grados de Maestría y Doctorado en Biología Celular los obtuvo en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en la Ciudad de México. Realizó dos estancias posdoctorales, una en la Sección de Patología del CINVESTA-IPN y la otra como "Visiting fellow for Advanced Research Experience in Biochemistry" en el "National Institute of Health", Bethesda, Maryland, USA. Ya como investigadora, realizó una estancia como Profesor visitante (visiting professor) en la "Case Western Reserve University School of Medicine. Department of Genetics", en la Universidad de Colorado en Fort Collins y en el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN. La Dra. Muñoz ha producido múltiples trabajos publicados en revistas de reconocido prestigio internacional con estricto arbitraje y dirigido 16 tesis de doctorado, 20 de maestría y 22 de licenciatura. Ha promocionado la ciencia mediante conferencias en diferentes foros Nacionales e Internacionales sumando un total de 268 y ha tenido diversas entrevistas en medios de comunicación a nivel Nacional e Internacional. Ha obtenido un total de 29 apoyos Nacionales (CONACYT) y 5 Internacionales (NIH, WHO). Recibió del IPN, un premio por su destacada actividad de investigación durante el año 2000 que se caracterizó por su alto nivel y calidad internacional; actividad reconocida por su permanencia en el Sistema Nacional de Investigadores desde 1985. Recibió otro premio por ser la directora de la mejor tesis de doctorado en el IPN (2007). Actualmente es nivel III del SNI.

Es una de las pioneras en la investigación en *Entamoeba histolytica* y descubrió el cap formado por anticuerpos específicos, los gránulos electrodensos y la actividad de la colagenasa que participan en la invasión a todos los tejidos del hombre; considerados marcadores de patogenicidad útiles en el diagnóstico, lo que generó una patente a nivel internacional. Sus investigaciones de genética de poblaciones del mosquito vector *Aedes aegypti* transmisor del dengue (DEN) en México y los receptores del DEN en los mosquitos en colaboración con la Universidad de Colorado en Fort Collins fue apoyado por donativos del NIH, EUA. Ha descrito recombinación y nuevos subtipos en el virus DEN y desarrollado un microarreglo para el diagnóstico de dengue, el serotipo y actualmente están implementando la detección del genotipo. En 1999 implementó el primer laboratorio en México experto en la extracción de DNA de restos óseos humanos de poblaciones prehispánicas Mexicanas. Para esto reunió un grupo interdisciplinario donde participan investigadores especialistas en antropología arqueología y genética de diferentes Instituciones. Recientemente ha sido invitada como "key speaker" para participar en "Population Genetics Conference" en Edinburg, Texas, USA (24-25 de Abril, 2008) y al "Interdisciplinary Exploration of Human Migration at the Interdisciplinary Commons of the University of Kansas" en Lawrence, Kansas, EUA.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 43-59. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Juan Carlos Martínez-Lazcano^{1,2}, Ma. Catherine Boll-Woehrlen³, Ma. de la Paz Alejandra Hernández-Melesio¹, Moisés Rubio-Osornio^{1,4}, Ma. Alicia Sánchez-Mendoza⁵, Camilo Ríos¹, Francisca Pérez-Severiano¹

¹Departamento de Neuroquímica. Instituto Nacional de Neurología. "Manuel Velasco Suárez". Insurgentes Sur # 3877, Col. La Fama, 14269, Tlalpan, México D.F., México

²Departamento de Neurofisiología. INN-MVS, México D.F., México

³Laboratorio de Investigación Clínica. INN-MVS, México D.F., México

⁴Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas. INN-MVS, México D.F., México

⁵Departamento de Farmacología. Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez".

Juan Badiano # 1, Col. Sección XVI. 14080, Tlalpan, México, D.F., México

fperez@innn.edu.mx

Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas incluyen: la afectación de las motoneuronas como en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y del control motor en la enfermedad de Parkinson (EP); factores genéticos dominantes como en la enfermedad de Huntington (EH) y trastornos de la memoria como en la enfermedad de Alzheimer (EA). Estudios epidemiológicos y experimentales demuestran diversos factores de riesgo, como la edad, defectos genéticos, anormalidades en enzimas antioxidantes, excitotoxicidad, anormalidades del citoesqueleto, autoinmunidad, deficiencia de minerales, estrés oxidativo (EO), toxicidad metabólica, hipertensión y desordenes vasculares. El EO desempeña un papel importante en la patología de las enfermedades neurodegenerativas dado que daña a ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y potencialmente promueve la apertura del poro de transición mitocondrial, lo cual a su vez puede estimular la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). En las enfermedades neurodegenerativas, la generación de altos niveles de EROs y una disminución en la participación de mecanismos antioxidantes resulta en muerte neuronal. El mecanismo de daño responsable de la neurodegeneración aún no está totalmente esclarecido, por lo que las terapias no ofrecen aún una cura real ante estos padecimientos. Existen tratamientos disponibles clínicamente y otros más que se exploran experimentalmente, entre ellos se incluye, la administración de antioxidantes, tales como los carotenoides, flavonoides y vitaminas entre otros.

Palabras clave: Enfermedades neurodegenerativas, estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno, antioxidantes.

Abstract

Neurodegenerative diseases include: the damage of motoneurons or motor pathways as it occurs in lateral amyotrophic sclerosis (ALS) and Parkinson's disease (PD); the participation of genetic factors as in Huntington's disease (HD), and memory impairment seen in Alzheimer's disease (AD). Epidemiological and experimental studies have demonstrated the participation of risk factors such as age, genetic defects, abnormal antioxidants enzymes, excitotoxicity, abnormalities in cytoskeleton, autoimmunity, mineral deficiency, oxidative stress, metabolic toxicity, hypertension and vascular disorders. Oxidative stress plays an important role in the pathology of neurodegenerative diseases due the damage on nucleic acids, proteins, lipids and potentially promoting the opening of the mitochondrial transition pore which further increases reactive oxygen species (ROS) production. In neurodegenerative diseases the high rate production of ROS in addition to a down regulation of antioxidants mechanism results in neural death. The mechanism responsible of damage in neurodegeneration is not fully known; therefore current therapies cannot offer a real cure. There are experimental therapies used both in humans and animal models, these include administration of antioxidants like carotenoids, flavonoids and vitamins among others.

Keywords: Neurodegenerative diseases, oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants.

Introducción

Los radicales libres (RL) son moléculas o átomos que portan uno o más electrones desapareados y son altamente reactivos. Pueden reaccionar con macromoléculas orgánicas conduciendo a daño celular y tisular, y consecuentemente a pérdida de la funcionalidad. Es conocido que los RL inducen daño oxidativo y este evento es importante en la fisiopatología de varias enfermedades humanas, incluyendo algunas que afectan al sistema nervioso [1]. La mayoría de las especies reactivas de oxígeno (EROs) que normalmente se producen en los sistemas biológicos provienen del metabolismo oxidativo mitocondrial, de la actividad de la enzima xantina oxidasa y en menor proporción de la autooxidación de catecolaminas y hemoproteínas que ocurren en el citoplasma, membrana nuclear, retículo endoplásmico y peroxisomas. Se denomina EROs al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), al anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Otro grupo de radicales libres que participan en procesos de transformación de las macromoléculas orgánicas son las especies reactivas del nitrógeno (ERN) entre las que se ubica principalmente al óxido nítrico ($\cdot\text{ON}$). Los EROs pueden interactuar con el $\cdot\text{ON}$ formando nuevas especies como lo es el anión peroxinitrito (ONOO^-), con alto poder oxidante.

El organismo tiene varios mecanismos de defensa para el control de una excesiva producción de RL, a través de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (Cat), y glutatión peroxidasa (GPx) [2] y de atrapadores de RL y antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), el ascorbato o vitamina C [2] y el β -caroteno, precursor de la vitamina A [2,3]. Sin embargo, cuando la generación de RL excede la capacidad de defensa antioxidante, se genera un estrés oxidativo (EO), causando daño tanto al ADN como a proteínas y lípidos [2]. El estrés oxidativo es el producto combinado de una excesiva formación de EROs y ERN y de una disminución en la eficacia de los sistemas antioxidantes endógenos. Estos factores

confluyen en la alteración estructural y funcional de las macromoléculas orgánicas, llevando a las células afectadas a procesos disfuncionales y a la muerte por necrosis o apoptosis.

Una de las especies radicales más agresivas y nocivas es el $\cdot\text{OH}$, el cual puede producirse en el cerebro bajo condiciones fisiológicas [4]. El $\cdot\text{OH}$, puede ser producido *de novo* por las células a partir de la transformación del radical $\text{O}_2\cdot^-$ y del H_2O_2 a través de la reacción de Fenton, o bien, a partir de la descomposición del ONOO^- . Diversas vías metabólicas pueden producir $\text{O}_2\cdot^-$ ó H_2O_2 en el cerebro [2]. El calcio (Ca^{2+}) intracelular desempeña un papel crítico en la formación de EROs, a través de canales asociados a receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) activados por los aminoácidos excitadores.

El EO y la neurodegeneración

El sistema nervioso central (SNC), incluyendo el cerebro, médula espinal y nervios periféricos, es rico en ácidos grasos insaturados y hierro (Fe^{3+}) [2]. El alto contenido de lípidos del tejido nervioso central, acoplado con una alta actividad metabólica lo hace particularmente vulnerable al daño oxidativo [5]. Se ha descrito que el Fe es esencial en el cerebro, particularmente durante el desarrollo, pero altas cantidades pueden llevar a la generación de daño en las células cerebrales debido a que los iones Fe^{3+} pueden conducir al estrés oxidativo, vía su acción catalizadora, formando consecuentemente EROs [6]. Existen evidencias sólidas de que el estrés oxidativo es un factor que participa en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas, tales como: enfermedad de Parkinson [7], enfermedad de Alzheimer [8], enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) [9]. Las evidencias incluyen reportes de disminución en la actividad enzimática antioxidante en pacientes con enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson [10]. También está evidenciada la participación de estrés oxidativo contribuyendo a la lipoperoxidación y la oxidación del ADN en la *substantia nigra* (SN), área cerebral afectada en la enfermedad de Parkinson [11]. En la enfermedad de Alzheimer y en la enfermedad de Huntington se ha descrito también un aumento en la lipoperoxidación, oxidación de ADN y oxidación de proteínas [12,13].

Enfermedades neurodegenerativas

Enfermedad de Parkinson (EP)

Clinica. El cuadro clínico descrito en 1817 por James Parkinson en su *Ensayo sobre la Parálisis Agitante* merece el nombre de enfermedad de Parkinson. La sintomatología de la enfermedad describe la presencia simultánea de hipertonía de un tipo especial, de acinesia y de temblor en reposo.. ,que aparece típicamente en la segunda mitad de la vida, su evolución es de progresión lenta y se producen lesiones anatómicas que van a afectar selectivamente a la SN del mesencéfalo. Se han descrito síndromes parkinsonianos de etiologías diversas. Su forma idiopática es probablemente la enfermedad neurodegenerativa más frecuente en México. Su diagnóstico es clínico y su confirmación es anatomopatológica. Macroscópicamente con la despigmentación de la SN y microscópicamente con los depósitos de Fe en dicho núcleo y la presencia de cuerpos de inclusión citoplásmicos, los llamados cuerpos de Lewy que tienen como principal componente una proteína malformada y agregada, la α -sinucleína [14]. También se puede afectar uno o ambos lados del cuerpo y la magnitud de la pérdida funcional puede variar. Los síntomas pueden ser leves al principio, por ejemplo, el paciente puede tener temblor leve o una sensación ligera de que una pierna o un pie están rígidos y se arrastra. Los síntomas abarcan: disminución de movimientos automáticos; dificultad para deglutir y babeo; alteración del equilibrio y la marcha; falta de expresión facial; dolores musculares; problemas con el movimiento; rigidez muscular con resistencia en rueda dentada; temblores; habla más tranquilo y lento; postura encorvada; seborrea; depresión, ansiedad, estrés y tensión, confusión y demencia.

La causa de la neurodegeneración de las células dopaminérgicas es desconocida a pesar de los avances en el conocimiento de los fenómenos neuroquímicos que subyacen a esta patología. Actualmente existe un gran interés por estudiar el proceso de degeneración neuronal y en particular el estudio del estrés oxidativo. Se sabe que pacientes con predisposición genética a ser más susceptibles a las neurotoxinas ambientales generadoras de reacciones oxidativas, son los que presentan una muerte neuronal mayor [15]. Los agentes tóxicos como el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y el paraquat sustentan dicha hipótesis, ya que inducen la producción de RL inestables que interactúan con los lípidos poliinsaturados de las membranas y llevan a la muerte neuronal específica de las células de la *SN, pars compacta (SNpc)*, tal como ocurre en el Parkinson idiopático [16]. Algunos estudios en cerebros *post mortem* de pacientes con la enfermedad, revelaron un aumento en los niveles de la lipoperoxidación, lo cual se asocia a un incremento en los niveles de Fe en la *SNpc* [17]. Así, también en el líquido cefalorraquídeo (LCR) se encontraron una disminución en los sistemas de defensa antioxidante y bajo contenido de glutatión reducido (GSH) [18].

Experimental. la *SNpc*, es la región cerebral dopaminérgica más afectada durante el establecimiento de la enfermedad, presentando en etapas tempranas, alteraciones bioquímicas tales como disminución en los niveles de glutatión reducido (GSH) y disminución en la respuesta antioxidante; reducción en la actividad del Complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial acompañada de una generación excesiva de $O_2^{\cdot-}$, sobreproducción de $\cdot ON$ a causa de la sobre expresión de la isoforma inducible de la sintasa del óxido nítrico (SONi), así como el incremento en el contenido total de Fe en esta región cerebral [19]. Además, la disminución en los niveles de GSH representa uno de los defectos bioquímicos tempranos más importantes [20, 21]. La relación entre GSH/GSSG (glutatión oxidado) disminuye durante la degeneración neuronal, lo cual favorece la formación de RL. Por otro lado, estudios de resonancia magnética espectroscópica, en pacientes con Parkinson demostraron la disminución cortical y subcortical en el metabolismo de la glucosa y aumento del lactato cortical [22], sugiriendo alteraciones del metabolismo energético. En relación a esto se reportó una disminución hasta de un 40% en la actividad del complejo I en plaquetas y músculo estriado de pacientes con la enfermedad [23], así mismo, se reportó en tejido nervioso una disminución del 30-40% en la actividad del complejo I en la *SNpc* [24] y en la corteza frontal [25] de cerebros *post mortem*. El desacople en la cadena transportadora de electrones causa un aumento de hasta siete veces más en la formación del radical $O_2^{\cdot-}$, así como de H_2O_2 [26], el cual también se ve incrementado por el recambio de dopamina, así como el metabolismo oxidativo de la monoamino oxidasa y a la auto oxidación de la dopamina más la formación de radicales quinonas ($\cdot QDA$). Actualmente, el incremento en el contenido de Fe de la *SNpc* de pacientes con Parkinson se ha convertido en un factor clínico de diagnóstico con una especificidad del 96% [27]. El Fe interactúa con el H_2O_2 y con la neuromelanina de forma reversible, modificando el estado redox del metal entre su estado ferroso y férrico (Fe^{2+} y Fe^{3+} , respectivamente), con la resultante formación cíclica del radical $\cdot OH$ [6] (Figura 1).

Por otro lado, algunos pacientes presentan una sobreproducción de $\cdot ON$ cerebral mediada por un incremento de Ca^{2+} que activa al receptor de tipo NMDA. El $\cdot ON$ participa en la citotoxicidad mediada por macrófagos y neutrófilos en la *SNpc* [28]. El $ONOO^{\cdot}$ es capaz de producir una reacción espontánea con los metales de transición de las metaloproteínas en los centros Fe-azufre de un considerable número de enzimas. y es considerado un factor causante del daño neuronal dopaminérgico en la enfermedad de Parkinson. La estabilidad inusual del $ONOO^{\cdot}$ contribuye a su toxicidad, ya que le permite difundir lejos de su sitio de formación y producir también la oxidación de macromoléculas celulares. Un índice de formación de $ONOO^{\cdot}$ son los residuos de tirosina libre y proteínas que el agente es capaz de nitrar [29]. Es así que, alteraciones en el estatus del $\cdot ON$ se relacionan con el padecimiento y constituyen un indicador importante de daño oxidante y nitrérgico en pacientes que cursan con esta enfermedad.

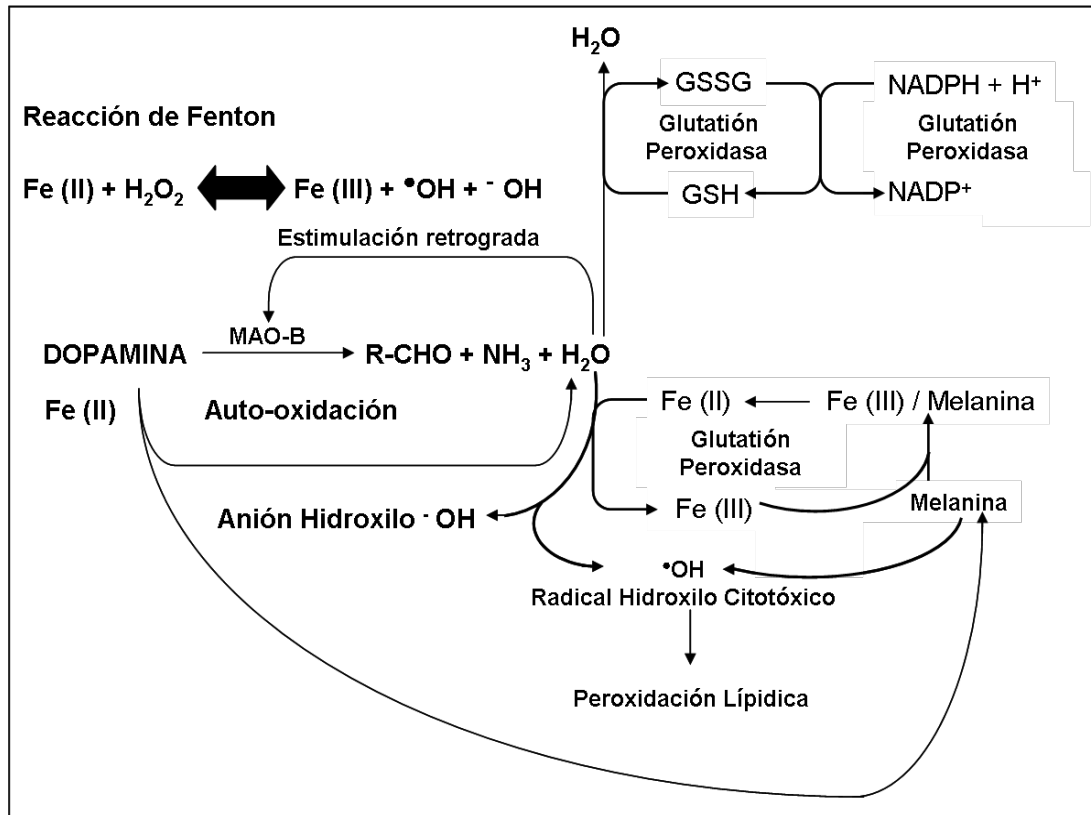


Figura 1. Ilustración del catabolismo de la DA por la acción de la MAO-B, así como la auto-oxidación de la DA. Modificado a partir de Gerlach *et al.*, 1994.

Después de aproximadamente 50 años de investigación sobre la enfermedad de Parkinson, aún no existe un tratamiento eficaz. La terapia actual está dirigida a reducir los síntomas y no así su progresión. La L-DOPA, precursora de la dopamina reduce los síntomas motores y es el fármaco más utilizado desde hace más de 40 años. Sin embargo, se estima que aproximadamente el 50% de los pacientes desarrollan complicaciones en los primeros 5 años de tratamiento [30]. Existe la terapia protectora, dirigida a preservar las neuronas remanentes, la cual administrada con el tratamiento farmacológico sintomático puede, a largo plazo, mejorar la expectativa de los pacientes con la enfermedad. Dado que el estrés oxidativo está presente en la enfermedad de Parkinson, existe la propuesta de que compuestos antioxidantes como el selenio, las vitaminas y la coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) tengan propiedades neuroprotectoras. El selenio es un elemento traza que se incorpora a las cisteínas de la GPx y selenoproteínas formando a la selenocisteína [31]. Las vitaminas C y E actúan como atrapadores primarios de RL. A pesar de que en estudios clínicos no fue posible encontrar efectos neuroprotectores, después de la administración de vitamina E, si se demostró que dosis altas de vitamina C y E retrasan la necesidad de la terapia sintomática durante 2.5 años [10,32]. La CoQ₁₀ o ubiquinona es un antioxidante potente atrapador de RL, además de ser un cofactor de las proteínas en la cadena transportadora de electrones y una molécula energética esencial dentro de esta cadena [33]. Datos recientes demuestran que la administración de dosis altas de CoQ₁₀ (1200 mg/día) en pacientes con Parkinson disminuyeron el deterioro de las funciones cuando fue evaluado en la escala UPDRS [33]. Sin embargo, a causa de los resultados contradictorios en los diferentes protocolos clínicos aún no hay cifras definitivas en la literatura.

Enfermedad de Alzheimer

Clinica. La demencia es un síndrome de deficiencia cognoscitiva definido por los criterios del DSM-IV como un deterioro de la memoria y al menos una de las siguientes alteraciones: trastornos del lenguaje o afasia, pérdida de adquisiciones motoras o apraxia, del reconocimiento de texturas, sonidos, formas, caras o agnosia y finalmente de las funciones ejecutivas que son abstracción, secuenciación y planeación. Los criterios de demencia contemplan una intensidad de estos trastornos suficiente para tener una repercusión social y funcional en los pacientes. La prevalencia de demencias en sujetos de más de 65 años de edad en los Estados Unidos es aproximadamente de 6 a 10%. La enfermedad de Alzheimer, representa dos tercios de estos casos por lo que se trata de la primera enfermedad neurodegenerativa en ese país donde la prevalencia es de más de 4 millones de casos [34]. Los criterios de demencia del tipo Alzheimer también están detallados en el manual DSM-IV, pero en la práctica neurológica se usan más los criterios NINCDS-ADRDA que definen claramente el diagnóstico de Alzheimer como posible, probable o definitivo.

El padecimiento es un desorden neurodegenerativo que se manifiesta clínicamente por la pérdida progresiva de la memoria, deterioro cognitivo, desorientación espacial y la pérdida de independencia del paciente [35]. Su progresión se asocia a cambios bioquímicos como el déficit colinérgico, el daño metabólico neuronal derivado de la excitotoxicidad por glutamato y el estrés oxidativo [36]. Anteriormente se consideraba que la edad era el principal factor de aparición de este tipo de demencia; sin embargo, en la actualidad se establece que su origen es multifactorial. Uno de los factores de riesgo que está asociado a un inicio temprano es la predisposición genética. Algunas mutaciones puntuales en la región codificante del péptido β amiloide en su proteína precursora (PPA; proteína precursora del amiloide), las mutaciones familiares en genes de las presenilinas (PS1/PS2) y la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E son eventos que favorecen el daño oxidativo [37].

La característica neuropatológica de la enfermedad es la presencia de agregados extraneuronales de β amiloide, las cuales forman a las placas seniles (PS) o placas neuríticas y además las estructuras intraneuronales, llamadas marañas neurofibrilares o NFT's, que son el resultado de la fosforilación anormal de la proteína tau, la cual se encuentra asociada a los microtúbulos [38].

Su diagnóstico probable, incluye un síndrome demencial y descarta otra enfermedad neurológica ó sistémica que lo pueda originar, también incluye una demencia establecida, agravación progresiva del déficit de memoria y otras funciones cognoscitivas, ausencia de alteración del estado de conciencia. Presenta su inicio entre los 40 y 90 años de edad, más a menudo después de los 65 años. Los marcadores sensibles y específicos se obtienen con estudios de neuroimagen, electroencefalográficos y del LCR con examen citoquímico.

Entre las múltiples teorías fisiopatológicas que intentan explicar el desarrollo del Alzheimer destacan dos hechos: por un lado, la formación de ovillos neurofibrilares en el interior celular y, por otro, el depósito extracelular de la proteína β amiloide. Estos dos hallazgos neuropatológicos traducen a la degeneración neuronal a través de un mecanismo de muerte celular programada (apoptosis). Este proceso comienza en centros cerebrales de tipo colinérgico, lo que llevó a postular la llamada teoría colinérgica de la enfermedad de Alzheimer, en la que se basa el uso de los fármacos actualmente disponibles para su tratamiento, los inhibidores de la esterasa de acetilcolina (AChE), como la rivastigmina, el donepecilo y la galantamina. Posteriormente se explotaron las propiedades de la memantina, un antagonista no competitivo de los receptores de tipo NMDA.

Experimental. Un aspecto de la enfermedad ampliamente analizado es la relación existente entre la presencia de las placas seniles y la severidad de la enfermedad. En estudios realizados en humanos y en ratones transgénicos se demostró que el daño cognitivo se presenta

antes de que se desarrollen las placas seniles y las NFT's [39]. El estrés oxidativo, desempeña un papel fundamental en la patología temprana de la enfermedad; esta hipótesis está apoyada por la evidencia de que la disfunción cognitiva de los pacientes y los modelos animales, se debe a la alteración de la transmisión sináptica, la cuál es promovida por la presencia de EROs. Además, el estrés oxidativo incrementa la producción y agregación del β amiloide y también favorece la hiperfosforilación de tau [40]. Se considera que existen varios mecanismos promotores de EROs durante la enfermedad; uno de ellos es el incremento de metales como Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} (Figura 2).

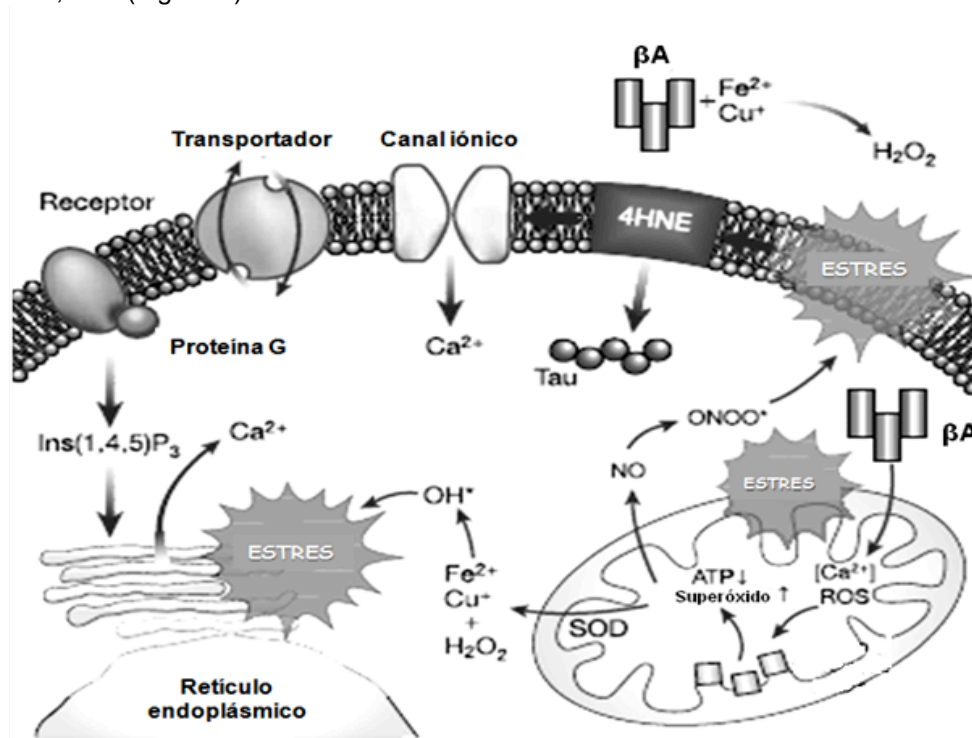


Figura 2. Formación de EROs por la interacción de βA con Fe^{2+} y Cu^+ . La agregación de βA en la membrana celular favorece la lipoperoxidación y la modificación oxidativa de transportadores de membrana como ATPasas y canales iónicos. Otros efectos neurotóxicos asociados son la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} , estrés del retículo endoplásmico y la agregación de la proteína tau.

Las regiones cerebrales que se afectan mayormente en la enfermedad de Alzheimer son la amígdala, la corteza y el hipocampo. Esto se relaciona con el incremento del Fe^{3+} en estas regiones. Además, la unión del Zn^{2+} y el Cu^+ con el β amiloide forma complejos que favorecen la agregación del péptido y la generación de H_2O_2 [41]. La presencia de EROs, a su vez, incrementa la expresión y la actividad de los complejos enzimáticos BACE 1 y secretasa- γ que participan en el procesamiento de la PPA, lo que genera un incremento en la producción de β amiloide₄₂, la cual tiene una mayor capacidad de agregación en comparación con β amiloide₄₀. Pravat y Pettegrew (2004) indican que los agregados de β amiloide son el resultado de la conversión de especies monoméricas solubles que tienen una configuración de α -hélice, en intermediarios amiloidogénicos de conformación β -plegada y que se estabilizan al formar oligómeros o ADDL's (de sus siglas en inglés: *amyloid β derived diffusible ligands*). La unión de los ADDL's da origen a otra estructura de agregación conocida como protofibrilla [42]. Finalmente, la interacción de las protofibrillas entre sí da lugar a las fibras amiloides. En estudios recientes se ha propuesto que los ADDL's tienen una mayor actividad neurotóxica que las otras estructuras.

Otro mecanismo promotor de estrés oxidativo, se refiere a la alteración prematura de la vasculatura cerebral por la acumulación de β amiloide en las paredes de los vasos sanguíneos de las meninges y el parénquima cerebral. La hipofuncionalidad endotelial se relaciona con la presencia de EROs y el incremento de hemorragias cerebrales en personas con antecedentes familiares de angiopatía vascular amiloide [43]. Finalmente, la sobreexpresión de las sintasas del \cdot ON neuronal e inducible (SONn y SONi) favorece el incremento del ambiente oxidante [44].

Existen diversos marcadores bioquímicos que ponen de manifiesto la relación existente entre el estrés oxidativo y las alteraciones celulares que ocurren en la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo: se genera un incremento de moléculas oxidadas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos por la presencia de la 3-nitrotirosina y la 3, 3'-ditirosina en el hipocampo, neocorteza y en el fluido ventricular cerebroespinal de pacientes con el padecimiento [45]. Además, la modificación del ADN nuclear y mitocondrial se asocia al incremento del marcador 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) tanto en la corteza, como en el cerebelo de pacientes, en comparación con sujetos controles de la misma edad [46]. La lipoperoxidación genera los productos acroleína, malondialdehído, 4-hidroxinonenal (HNE) y los derivados oxidados del ácido araquidónico (F2-IsoPs: F2-isoprostanos) y del ácido docosahexaenoico (F4-NeuroPs: F4-neuroprostanos). Y se ha demostrado que existe una relación entre el incremento de HNE en cultivos de células hipocampales y la alteración de la función de ATPasa de Na^+/K^+ [47].

Debido a la relación que existe entre la presencia del estrés oxidativo y el déficit cognitivo, se propuso el uso de antioxidantes como terapia farmacológica con el fin de inhibir la formación de EROs o bien promover su captura e inactivación. Actualmente se conoce una gran variedad de antioxidantes, algunos de ellos son antioxidantes que provienen de alimentos y bebidas. Tal es el caso de los polifenoles contenidos en el vino tinto: miricetina, morina, quercetina, kaempferol, catequina y epicatequina. Ono et al., (2006) indican que dichos compuestos poseen propiedades neuroprotectoras tanto *in vivo* como *in vitro*, pues además de atrapar a los EROs también se unen al β amiloide soluble y evitan la formación y polimerización de las fibrillas amiloideas. Otros antioxidantes anti-amiloidogénicos son los ácidos tánico, rosmarínico y nordihidroguaiarético, la curcumina, la melatonina y la nicotina [48].

Es importante mencionar que el éxito de los antioxidantes en la prevención del deterioro cognitivo se apoya en estudios realizados en ratones transgénicos que expresan diferentes mutaciones de la proteína precursora del amiloide. El tratamiento basado en la administración, solamente de ácidos grasos poliinsaturados (Ω -3) derivados del ácido docosahexaenoico, el ácido lipóico o la S-alil-cisteína, incrementa el desempeño de los animales en pruebas de memoria espacial [49]. Uno de los antioxidantes que se utiliza en la clínica es el α -tocoferol. En un estudio multicéntrico doble ciego controlado con placebo, en 341 pacientes con la enfermedad, con un grado de moderado a severo, se les administró α -tocoferol y se vió un retraso en el deterioro cognitivo. Este mismo efecto se demostró con la administración de la desferrioxamina un quelante de iones metálicos y con el tenilsetam [50]. En modelos animales, la administración de fármacos quelantes de Zn^{2+} y Cu^+ disminuyó el depósito de βA [51].

Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

Clínica. La ELA es una enfermedad neurodegenerativa de progresión rápida con pérdida de motoneuronas superiores e inferiores la cual es considerada la principal característica patológica y la causa de los signos clínicos que presentan los pacientes [9]. El cuadro clínico de ELA se caracteriza por debilidad muscular combinada con espasticidad, hiperreflexia y signo de Babinski debida a la afectación de motoneuronas superiores, amiotrofia, calambres y fasciculaciones por afectación de motoneuronas inferiores [52]. La muerte en estos pacientes se produce fundamentalmente por colapso de la función respiratoria, incluyendo hipoxia, arritmias cardíacas e infecciones bronco-pulmonares, aproximadamente tres años posteriores a la aparición de los síntomas [52].

La incidencia de la enfermedad es de 1.5 a 2.5 casos por 100 000 habitantes/año. Predomina en los hombres con una proporción de 1.7 a 2 por cada mujer. En México un estudio publicado en el año 2006, reporta que la frecuencia de ELA muestra una curva ascendente a lo largo de los 31 años revisados [53]. Factores como: la edad de inicio, el sitio de inicio, el estado funcional y el grado de deficiencia respiratoria en el momento del diagnóstico, condicionan el pronóstico [54]. Las formas esporádicas representan 90% de los casos mientras que una pequeña proporción de las formas familiares (10%) contienen un factor de tipo genético, asociado a mutaciones en el cromosoma 21 en la región del gen que codifica para la superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn (SOD1). En la actualidad, el diagnóstico de ELA se define como probable, posible o definido (cierto) a partir de los criterios revisados en "El Escorial" [55]. Estos criterios se basan en la presencia de signos clínicos o electrofisiológicos de afección de las motoneuronas central o periférica (también llamada superior o inferior) en cuatro diferentes territorios: bulbar, cervical, torácico y lumbar. La evaluación clínica de los pacientes, integra generalmente una escala funcional como la ALS FR-R (escala funcional de ELA revisada), la cual contempla la capacidad de autocuidado y la función respiratoria del paciente [56].

Experimental. Aunque en la mayoría de los casos de ELA, la etiología es desconocida existen diferentes hipótesis para explicar el mecanismo de daño y estas incluyen: factores ambientales, fenómenos de autoinmunidad, estrés oxidativo, excitotoxicidad, infecciones virales, anomalías en el citoesqueleto y pérdida del soporte para el tráfico intracelular, siendo de particular interés el estrés y la excitotoxicidad para las cuales existen múltiples evidencias [57]. El descubrimiento de la mutación en el gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) en familias con ELA, permitió el desarrollo del primer modelo transgénico y la implicación del papel potencial de los RL dentro de la patogénesis del padecimiento, sin embargo la actividad de la SOD en los casos esporádicos, parece ser normal. La administración de antioxidantes en el ratón transgénico de ELA pudo detener la aparición del genotipo degenerativo y prolongar la sobrevivencia [58]. Esto sugirió que los procesos de degeneración involucrados en este ratón son disparados por estrés oxidativo cuando la progresión involucra indudablemente excitotoxicidad [57,9] (Figura 3). Existen anomalías producto del daño oxidativo en proteínas de la corteza y espina lumbar de muestras *post mortem* de pacientes con ELA [59], algunos estudios observaron un aumento en la inmunoreactividad a nitrotirosina en motoneuronas de la espina. Además, experimentalmente la inducción de estrés oxidativo *in vivo* puede producir muerte de motoneuronas en el cordón espinal de rata [59]. Las primeras evidencias de la excitotoxicidad en la ELA fueron propuestas formalmente por Plaitakis en estudios donde demuestra cambios en los niveles de glutamato en plasma, fluido cerebro espinal y en cerebros de pacientes *post mortem* con ELA. Más recientemente, los trabajos realizados por el grupo de Rothstein (1995) demuestran alteraciones en la recaptura del glutamato en preparaciones de tejido *post mortem* de corteza motora y de espina lumbar, debida a la pérdida selectiva de uno de los subtipos del transportador de glutamato, EAAT-2, el cual es expresado únicamente en células gliales [60]. Debida a que los niveles del ARNm del EAAT-2, no están modificados, ello sugiere que las alteraciones son de tipo post-transcripcional. A este respecto es importante señalar que, los transportadores a glutamato muestran una alta sensibilidad hacia el ataque por RL *in vitro* [60]. Entre las hipótesis de RL y excitotoxicidad en la etiología de la ELA, estas evidencias cuestionan, si las alteraciones en el metabolismo del glutamato son causa o consecuencia de la enfermedad [59].

Estudios patológicos muestran también la presencia de anomalías mitocondriales en motoneuronas provenientes de pacientes con ELA, implicando a este organelo en la patogénesis de esta enfermedad. También en células provenientes de ratones transgénicos de la SOD1 mostraron anomalías mitocondriales y una disminución en la actividad de la cadena transportadora de electrones y en el potencial de membrana de la mitocondria, alterando la homeostasis del Ca^{2+} , incrementando el daño al ADN mitocondrial y modificaciones en el proteosoma que incluyen reducción en los mecanismos de defensa antioxidante en la mitocondria [9].

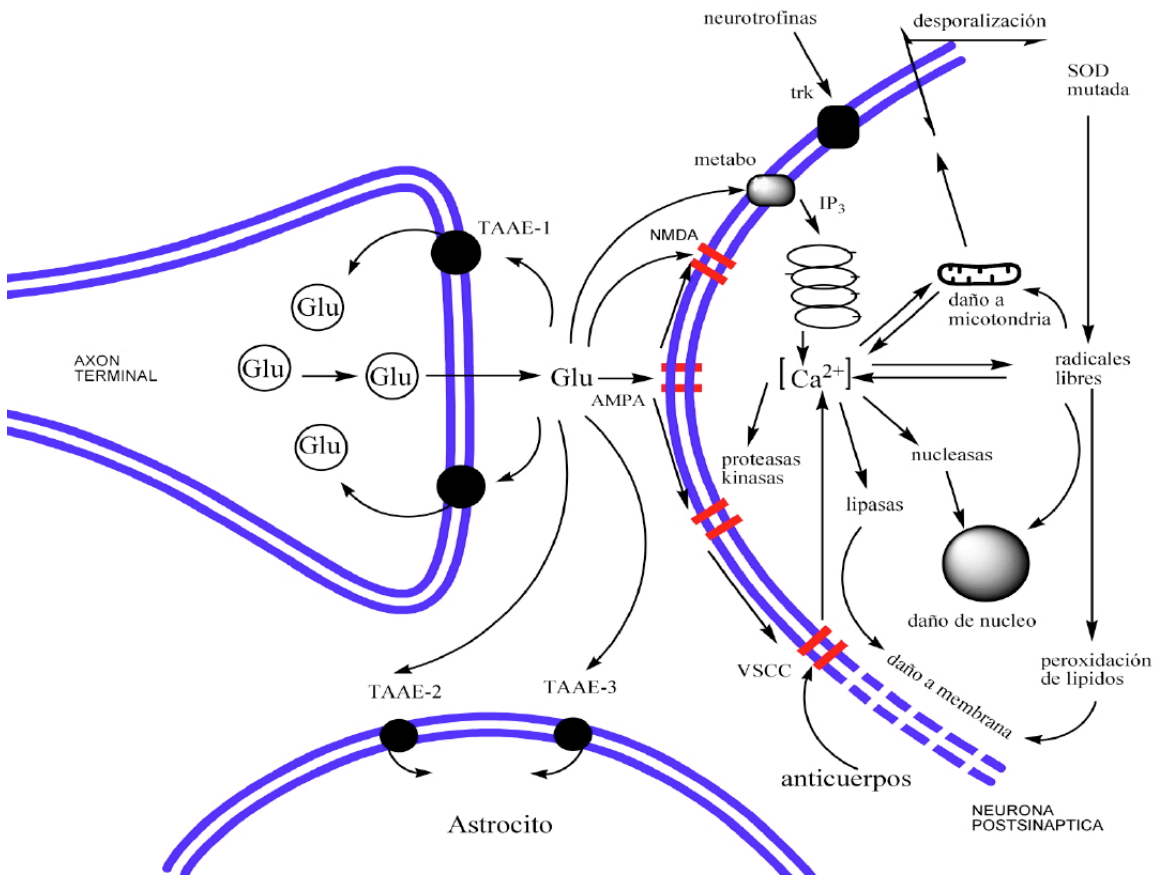


Figura 3. Esquema que muestra los mecanismos probables involucrados en los procesos de daño en la ELA incluyendo la formación de radicales libres. Modificado de Louvel 1997.

En ELA existe una vulnerabilidad selectiva del grupo de motoneuronas, con la aparente protección hacia algunos grupos neuronales, como las neuronas oculomotoras y el núcleo de Onuf. Un factor importante de esta vulnerabilidad puede ser la diferencia en la habilidad celular para contrarrestar incrementos en los niveles de Ca^{2+} . Las motoneuronas presentan corriente baja a proteínas con Ca^{2+} , parvalbumina y calbindina D-28k, con excepción de algunas del tracto oculomotor y el núcleo de Onuf precisamente los protegidos en la ELA, la parvalbumina y la calbindina, protegen de la excitotoxicidad a partir de la medición del receptor para el ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propionico/kainato (AMPA) pero no median la actividad de los receptores de tipo NMDA, de forma similar las neuronas que contienen calbindina, son más resistentes a EO [9].

El riluzole fue uno de los primeros fármacos, aprobado en 1996, para el tratamiento de la ELA, junto con un tratamiento de factores tróficos. Los tratamientos con agentes neuroprotectores con función antioxidante como la N-acetilcisteína o selegilina no han sido exitosos. Recientemente Fornai et al., demostraron que, dosis diarias de litio retardan la progresión de pacientes con ELA [61]. Paralelamente probaron el tratamiento con litio en un modelo transgénico de ELA y observaron la misma protección [61]; estos resultados son aún discutidos, dado el pequeño grupo de sujetos que participaron en el ensayo. Hoy en día el único tratamiento con eficacia clínica sigue siendo el agente anti-glutamatérgico, riluzole que prolonga la supervivencia de 3 a 6 meses pero no mejora la fuerza muscular ni la calidad de vida de los pacientes[62].

Enfermedad de Huntington

Clinica. La enfermedad de Huntington es un trastorno neurodegenerativo, autosómico dominante caracterizado por movimientos involuntarios como la corea, así como anomalías del movimiento voluntario. Hay pérdida cognoscitiva y trastornos psiquiátricos. Las neuronas espinosas medianas del estriado son las que degeneran y tiende a generalizarse con el paso de los años. La atrofia estriatal determinada por estudios de neuroimagen apoya el diagnóstico. La prevalencia de la enfermedad es de 5 a 10 casos por 100,000 habitantes con aproximadamente 30,000 casos en Estados Unidos. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” están registrados más de 700 sujetos de los cuales alrededor de 600 tienen diagnóstico confirmado mediante prueba molecular. Esta última consiste en la identificación de una expansión anormal de trinucleótidos CAG (citosina-adenina-guanina) en el alelo mutado del gen de la huntingtina (htt), en el brazo corto del cromosoma 4 [63]. Las primeras manifestaciones generalmente ocurren entre la cuarta y la quinta década de vida, aunque existe una forma denominada juvenil y otra denominada adulta. Las manifestaciones motoras incluyen un seguimiento ocular incompleto, lentitud de los movimientos sacádicos oculares provocados, aumento del tono muscular (rigidez), movimientos involuntarios, afección del lenguaje, de la deglución, de la coordinación y finalmente de la marcha y del equilibrio. El *Huntington Study Group* elaboró, en 1996, una escala clinimétrica que contempla todos estos rubros así como una parte funcional con las actividades de la vida diaria que puede realizar el paciente, una escala psiquiátrica de comportamiento y finalmente pruebas cognoscitivas [64]. Los tratamientos se dividen en 3 grupos. El tratamiento convencional de la corea se basa en el uso de bloqueadores de receptores dopaminérgicos (haloperidol) y la depleción en dopamina (tetrabenazine). También se usan antipsicóticos atípicos y otras medicaciones anticoréicas como la apomorfina y la bromocriptina. El tratamiento de los síntomas psiquiátricos consiste en antidepresivos, ansiolíticos (benzodiazepinas), el tratamiento de la irritabilidad y agresividad con antipsicóticos, de la hipersexualidad con medroxiprogesterona, de la demencia con inhibidores de la colinesterasa o con memantina, de las obsesiones con olanzapina. Finalmente, las estrategias neuroprotectoras son los antagonistas del glutamato: amantadina, remacemida y riluzole, los ácidos grasos insaturados, la creatina, la minociclina como antiapoptótico mediante la inhibición de caspasas 1 y 3 y la coenzima Q₁₀ [65].

Existen evidencias, obtenidas de estudios en pacientes con la enfermedad de Huntigton, que sugieren que los procesos excitotóxicos, el estrés oxidativo y la alteración del metabolismo energético, están involucrados con la etiología de la enfermedad. El hallazgo de niveles de productos de daño oxidativo en áreas de degeneración en cerebros de pacientes, así como el incremento en la producción de RL en modelos animales, indican la participación del estrés oxidativo, ya sea como una causa o como un constituyente secundario de la cascada de muerte celular en la enfermedad [66]. Se ha encontrado en el caudado-putamen de pacientes con el padecimeinto que están incrementados los productos del estrés oxidativo, tal como el 8-OHdG y lipofucsina [66]. Además, la actividad mitocondrial de aconitasa (la inactivación es un indicador de estrés oxidativo) se encuentra severamente reducida en el caudado-putamen ,lo que implica un incremento del estrés oxidativo [67]. Finalmente, hay evidencias, de daño oxidativo al ADN mitocondrial en la corteza parietal [68]; así como también, hay evidencias de la producción aumentada de RL en el cerebro de pacientes con la enfermedad y ratones transgénicos [67,69].

Experimental. Entre los mecanismos propuestos en el establecimiento de la enfermedad se encuentran: disfunciones mitocondriales, mecanismos apoptóticos [70], toxicidad por agregados de htt, que involucran desregulación transcripcional; [71] por el secuestro de factores de transcripción por parte de los agregados de la htt mutada (mhtt), mecanismos de excitotoxicidad en los que se describe la muerte celular a partir de la sobreestimulación de los receptores para aminoácidos excitadores (principalmente NMDA), con la consecuente generación de RL y daño oxidativo como parte importante en el proceso de neurodegeneración [72]. En algunos modelos experimentales se encuentran indicios de la participación de procesos

inflamatorios y activación de microglia [73], activación de transaminasas cerebrales, las cuales muestran un incremento en la reactividad con proteínas que contienen repetidos poli Q como la mhtt [74], además de catalizar la inactivación de la 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDHC) en presencia de dominios de poli Q (Figura 4). También se ha propuesto la hipótesis kinurinérgica, en donde se involucran alteraciones el metabolismo del triptofano por la vía de la kinurenina existiendo evidencia, tanto clínica como básica de cambios en las concentraciones de los metabolitos y en las actividades de sus enzimas limitantes [75].

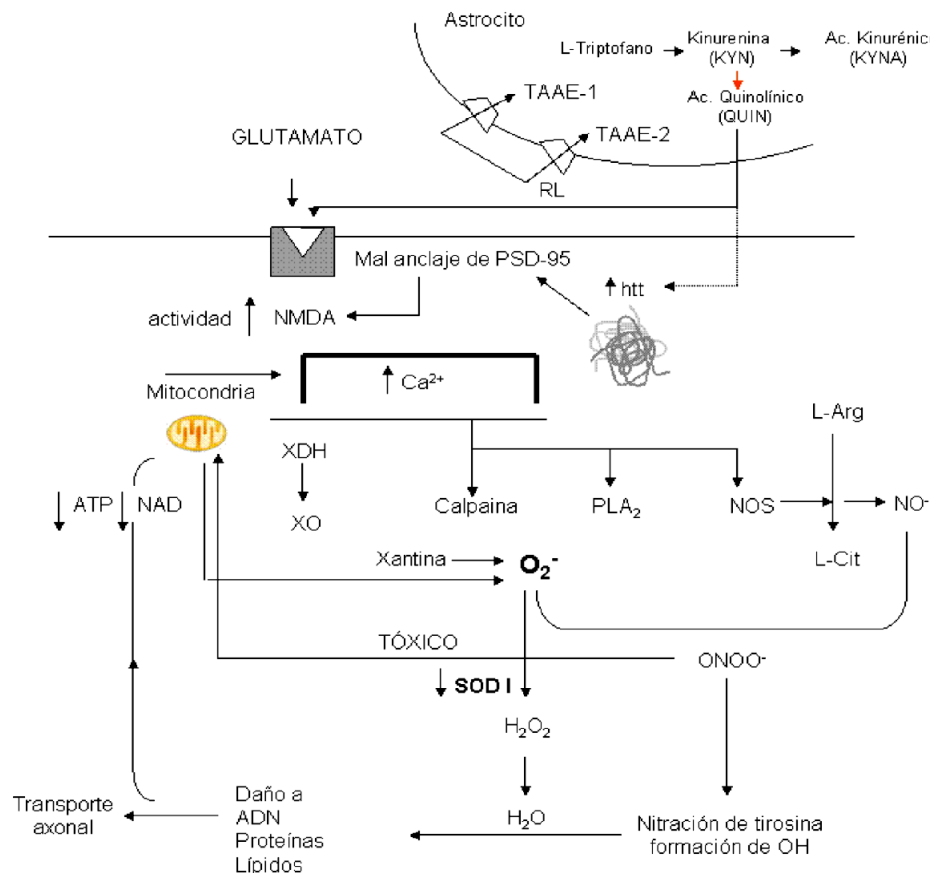


Figura 4. Esquema que representa la interacción de la mhtt y la alteración de otros sistemas en la neurona. Modificado de [59].

En modelos experimentales como los modelo transgénico R6/1 y R6/2, se demostró el incremento de 3-nitrotirosina [69], y de la lipoperoxidación, aumento de la actividad de la SON [76] y un incremento progresivo de 8-OHdG [77].

En un estudio realizado recientemente en cerebros *post mortem* de pacientes con la enfermedad se demostró un aumento en la generación de EROs en células neuronales y no neuronales y se encontró una correlación directa entre la activación de la microglia y la neurodegeneración. La activación de la microglia sobreactiva a la NADPH oxidasa (productora de EROs), por lo que es posible que la inactivación de NADPH oxidasa tenga una aplicación terapéutica. Dado que las EROs en la microglia actúan como un segundo mensajero que amplifica su acción proinflamatoria y media la neurotoxicidad, se cree posible también que una terapia con antiinflamatorios reducirá la actividad de la microglia y consecuentemente se atenuará la progresión de la enfermedad. En el mismo estudio se reportan alteraciones en la

aconitasa. Adicionalmente, demostraron cambios en la expresión de las proteínas de tipo peroxidasa (Prx), las cuales pertenecen a la familia de las enzimas eliminadoras de peróxido (Prx, GPx y cat) y son un mecanismo de defensa antioxidante. Interesantemente demostraron que había un incremento en la expresión de Prx1 y Prx6, que correlaciona con una disminución en el estrés oxidativo al cambiar el ambiente ácido de la Prx1 por una oxidación en el residuo Cys52, poniendo en evidencia una mejor actividad dependiente del pH [78].

Los cambios de pH en el padecimiento resultan de interés, debido a que se ha demostrado una modulación del receptor de tipo NMDA por un sitio sensible a cambios de pH. La actividad del receptor para NMDA es inhibida por cambios de pH en el ambiente extracelular. A este respecto, el probenecid (fármaco que inhibe la excreción de ácidos orgánicos desde la barrera hematoencefálica), demostró efectos neuroprotectores en un modelo de excitotoxicidad de la enfermedad de Huntington, apoyando la importancia de los cambios en el pH extracelular a fin de lograr la neuroprotección [79,80].

Diversos estudios demuestran que la excitotoxicidad es producto de la combinación de un incremento en las concentraciones de glutamato y la liberación de agonistas glutamatérgicos desde las aferencias situadas en la corteza, reducción en la recaptura de glutamato por parte de la glia, hipersensibilidad de receptores NMDA postsinápticos, alteración en la homeostasis intracelular del Ca^{2+} y disfunciones mitocondriales. Existe una alteración en la interacción de la mhtt y la proteína de anclaje PSD-95, la cual puede incrementar la estabilidad y la actividad del receptor para NMDA, por lo tanto, las terapias utilizadas para detener el avance de la enfermedad es utilizado diferentes diversos inhibidores glutamatérgicos, incluidos la remacemida, amantadina, lamotrigina, riluzole y memantina. Aunque algunos estudios afirman que estos agentes tienen efecto sobre algunos síntomas principalmente en los desordenes de movimiento, ninguno tienen una evidencia clara sobre el hecho de que puedan detener la neurodegeneración. Estudios más recientes involucran a la vía dopaminérgica, como inductor de excitotoxicidad, dado que la dopamina se encuentra en grandes concentraciones en el estriado y ésta podría producir una activación de neuronas estriatales con alta sensibilidad a la htt a través de mecanismos que involucran la activación de receptores dopaminérgicos (D2), por lo tanto el uso de co-tratamientos anti-glutamatérgicos y anti-dopaminérgicos se considera importante [78].

Consideraciones generales

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de enfermedades del SNC con diferentes etiologías: esporádicas, hereditarias y algunas secundarias a procesos metabólicos tóxicos. Debido a su prevalencia, morbilidad y mortalidad, estas enfermedades presentan un significado médico, social y financiero importante en la sociedad. Neuropatológicamente éstas se caracterizan por anomalías en regiones específicas del cerebro y daño en una población particular de neuronas. Los grupos de neuronas degeneradas en las diferentes enfermedades determinan el fenotipo clínico de cada una en particular. La investigaciones recientes han identificado genes específicos para varios desordenes neurodegenerativos con el fin de estudiar los factores etiológicos y proponer mecanismos de daño. Por lo que el objetivo en neurociencias es, el entendimiento de los conceptos fundamentales de estos desordenes, el reconocimiento morfológico, neuroquímico y conductual de cada enfermedad y el entendimiento de su desarrollo y progresión para ofrecer alternativas terapéuticas para cada enfermedad individual.

A lo largo de cada enfermedad neurodegenerativa se proponen varios mecanismos que involucran a la excitotoxicidad para explicar la muerte neuronal característica de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la elevación intracelular de Ca^{2+} , generación de RL, daño en la función mitocondrial y activación de programas de apoptosis y de autofagia.

El estrés oxidativo es un factor fuerte que ocurre cuando hay un exceso de RL y/o disminución de los sistemas antioxidantes. Hay evidencia de que un incremento en el metabolismo energético por la vía aeróbica aumenta la concentración de RL, lo cual a su vez aumenta el daño a membranas lipídicas, induciendo daño a las estructuras cerebrales, especialmente cuando la defensa fisiológica llega a ser ineficiente.

A lo largo de esta revisión se pone de manifiesto también el metabolismo desregulado de los metales (Fe, Cu) los cuales desempeñan un papel catastrófico en la catálisis de reacciones químicas que conducen a un estrés oxidativo como causa final. Los metales son cruciales como cofactores para llevar a cabo un gran número de reacciones enzimáticas catalíticas en el metabolismo celular y la señalización celular. Alguna mutación en el ADN mitocondrial o una sobreacumulación de un metal en cerebro conduce a un ambiente oxidante y la formación de RL que median cambios patológicos en las neuronas. Proteínas neuronales y componentes estructurales consiguen modificarse debido al estrés oxidativo produciendo diferentes desordenes neurológicos conduciendo a neuroinflamación y pérdida de la función cognitiva en las diferentes enfermedades expuestas anteriormente (enfermedad de Parkinson, Alzheimer, de Huntington y la Esclerosis lateral amiotrófica).

Ya que en esta revisión el estrés oxidativo es definido como una causa principal en la neurodegeneración, es razonable la propuesta de los tratamientos antioxidantes como opciones terapéuticas para combatir la generación de RL, además de reconocer otros tratamientos farmacológicos ampliamente utilizados tanto en la clínica como en la investigación básica.

Hasta aquí revisamos algunas evidencias de que los agentes oxidantes y nitrantes generados por procesos biológicos anormales tienen la capacidad de infringir serios daños a moléculas de vital importancia en el tejido nervioso en las enfermedades neurodegenerativas. Tales signos han sido probados, reproducidos y corroborados en modelos experimentales de cada enfermedad en donde se ha evaluado el efecto de un sin número de alternativas terapéuticas y se destaca preferentemente el efecto de los antioxidantes. Aún sin que los estudios sean definitivos, y dada la evidencia acumulada del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas, podemos considerar que moléculas con cualidades antioxidantes o atraparoras de RL seguirán siendo evaluadas a fin de encontrar un tratamiento eficaz.

Referencias

1. Delanty, N. y Dichter, M.A. (1998) *Acta. Neurol. Scand.* **98**, 145-153
2. Halliwell, B. (2001) *Drugs. Aging.* **18**, 685-716
3. Beckman, J., Beckman, T., Chen, J., Marshall, P. y Freeman, A. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1620-1624
4. Hammer, B., Parker, W.D. y Bennett J.P. (1993) *Neuroreport.* **5**, 72-4
5. Dawson, T.M. y Dawson, V.L. (1996) *Annu. Rev. Med.* **47**, 219-27
6. Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P. y Youdim, M.B. (1994) *J. Neurochem.* **63**, 1609-1623
7. Ebadi, M., Srinivasan, S.K. y Baxi, M.D. (1996) *Prog. Neurobiol.* **48**, 1-19
8. Markesbery, W.R. y Carney, J.M. (1999) *Brain. Pathol.* **9**, 133-46
9. Barber, S.C. y Shaw, P.J. (2010) *Free. Radic. Biol. Med.* **48**, 629-641
10. Fahn, S. y Cohen, G. (1992) *Ann. Neurol.* **32**, 804-12
11. Jenner, P. y Olanow C.W. (1996) *Neurology.* **47**, 161S - 170S
12. Retz, W. Gsell, W., Munch, G., Rosler, M. y Riederer, P. (1998) *J. Neural. Transm. Suppl.* **54**, 221-36
13. Borlongan, C.V., Kanning, K., Poulos, S.G., Freeman, T.B., Cahill, D.W. y Sanberg, P.R. (1996) *J. Fla. Med. Assoc.* **83**, 335-41
14. Hughes, A.J., Ben-Shlomo, Y., Daniel, S.E. y Lees, A.J. (2001) *Neurology.* **57**, S34-38

15. Hertzman, C. (1990) *Am. J. Int. Med.* **17**: 349-356
16. Jenner, P., Schapira, A.H. y Marsden, D. (1992) *Neurology.* **42**, 2241-2250
17. Dexter, D.T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Jenner, P. y Marsden, C.D. (1991) *Brain.* **114**, 1953-1975
18. Boll, M.C., Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S. y Rios, C. (2008) *Neurochem. Res.* **33**, 1717-1723
19. Blum, D. (2001) *Prog. Neurobiol.* **65**, 135-172
20. Bharath, S., Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalan, S. y Andersen, J. (2002) *Biochem. Pharmacol.* **64**, 1037-1048
21. Tsang, A. y Chung, K. (2009) *Biochim. Biophys. Acta.* **1792**, 643-650
22. Bowen, B.C., Block, R.E. y Sanchez-Ramos, J. (1995) *Am. J. Neuroradiol.* **16**, 61-68
23. Schulz, J.B. y Beal, M.F. (1994) *Curr. Opin. Neurol.* **7**, 333
24. Schapira, A., Cooper, J., Dexter, D. y Marsden, C. (1990) *J. Neurochem.* **54**, 823-827
25. Parker, W. (2008) *Brain. Res.* **1189**, 215-218
26. Beal, F. (1995) *Ann. Neurol.* **38**, 357-366
27. Walter, U., Niehaus, L., Probst, T., Benecke, R., Meyer, B. y Dressler, D. (2003) *Neurology.* **60**, 74-77
28. Hunot, S. (1996) *Neuroscience.* **72**, 355-363
29. Rubio-Osornio, M., Montes, S., Pérez-Severiano, F., Aguilera, P., Floriano-Sánchez, E., Monroy-Noyola, A. y Ríos, C. (2009) *Neurochem. Internat.* **54**, 447-51
30. Toulouse, A. y Sullivan, A. (2008) *Progress. Neurobiol.* **85**, 376-392
31. Chen, J. y Berry, M. (2003) *J. Neurochem.* **86**, 1-12
32. Olanow, W. (2003) *Lancet. Neurol.* **2**, 74
33. Shults, C. (2003) *Curr. Med. Chem.* **10**, 1917-1921
34. Hendrie, H.C. (1998) *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* **6**, S3-S18
35. Yates, D. y McLoughlin D.M. (2007) *Psychiatry.* **7**, 1-5
36. Mattson, M.P. y Chan, S.L. (2003) *Cell. Calcium.* **34**, 385-397
37. Kumar-Singh S., Cras P., Wang R., Kros J.M., Van Swieten J., Lübke U., Ceuterick C., Serneels S., Vennekens K., Timmermans J.P., Van Marck E., Martin J.J., Van Duijn C.M. y van Broeckhoven, C. (2002). *Am. J. Pathol.* **161**, 507-515
38. Wirths O., Multhaup G. y Bayer, A. (2004) *J. Neurochem.* **91**, 513-520
39. Soto, C., Saborio, G.P. y Permanne, B. (2000) *Acta. Neurol. Scand. Supplement.* **176**, 90-95
40. Tong, Y., Zhou, W., Fung, V., Christensen, M.A., Qing, H., Sun, X. y Song, W. (2005) *J. Neural. Transm.* **11**, 2455-469
41. Atwood, C., Obrenovich, M., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith M. y Martins, R. (2003) *Brain. Res. Rev.* **43**, 1-16
42. Pravat, K.M. y Pettegrew, J.W. (2004) *Neurochem. Res.* **29**, 2267-2272
43. Racke, M.M., Boone, L.I., Hepburn, D.L., Parsadainian, M., Bryan, M.T., Ness, D.K., Piroozii, K.S., Jordan, W.H., Brown, D.D., Hoffman W.P., Holtzman, D.M., Bales, K.R., Gitter, B.D., May, P.C., Paul, S.M. y De Mattos, R.B. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 629-636
44. Butterfield, D.A., Reed, T., Newman, S.F. y Sultana, R. (2007) *Free. Radic. Biol. Med.* **43**, 658-677
45. Marlatt, M.W., Lucassen, P.J., Perry, G., Smith, M.A., y Zhu, X. (2008) *J. Alzheimer's. Dis.* **15**, 199-210
46. Chandrashekhar, D.K., Gadal, S., Mhatre, M., Williamson, K.S., Pye, Q.N. y Hensley, K. (2008) *J. Alzheimer's. Dis.* **15**, 473-493
47. Sonnen, J.A., Breitner, J.C., Lovell, M.A., Markesbery, W.R., Quinn, J.F., Montine, T.J. (2008) *Free. Radical. Biol. Med.* **45**, 219-230
48. Ono, K., Hamaguchi, T., Naiki, H. y Yamada, M. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.* **1762**, 575-586
49. Pérez-Severiano, F., Salvatierra-Sánchez, R., Rodríguez-Pérez, M., Cuevas-Martínez E.Y., Guevara, J., Limón D., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverrí, J. y Santamaría, A. (2004) *Eur. J. of Pharmacol.* **489**, 197-202
50. Smith, M.A., Casadesus, G., Joseph, J.J. y Perry, G. (2002) *Free. Radic. Biol. Med.* **33**, 1194-1199

51. Wolfe, M. (2002). *Nat. Rev.* **1**, 859-866
52. Vargas-Cañas, S. Epidemiología. (2006) En: Enfermedades Neurodegenerativas. Corona, T. y López-Meza E. México D.F. 10-16
53. Arriada-Mendioca, N., Ríos, C., Otero-Siliceo, E. y Corona-Vázquez, T. (2000) *Arch. neurociencias.* **5**, 2-5
54. Soriani, M.H. y Desnuelle, C. (1999) *Rev. Neurol. (Paris)* **165**, 627-640
55. Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M. y Munsat, T.L. (2000) *Amyotroph. Lateral. Scler. Other. Motor. Neuron. Disord.* **1**, 293-299
56. Cedarbaum, J.M., Stambler, N., Malta, E., Fuller, C., Hilt, D. y Thurmond, B. (1999) *J. Neurol. Sci.* **169**, 13-21
57. Cluskey, S. y Ramsden, D.B. (2001) *Mol. Pathol.* **54**, 386-392
58. Louvel, E., Hugon, J. y Doble, A. (1997) *Trends. Pharmacol. Sci.* **18**, 196-203
59. Cookson, M.R., Shaw, P.J. (1999) *Brain. Pathol.* **9**, 165-186
60. Rothstein, J.D. (1995) *Clin. Neurosci.* **3**, 348-59
61. Fornai, F., Longote, P., Cafaro, L., Kastsiuchenka, O., Ferrucci, M. y Manca, M.L. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 2052-2057
62. Bryson, H.M., Fulton, B. y Benfield, P. (1996) *Drugs* **52**, 549-63
63. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993) *Cell.* **72**, 971-83
64. Huntington Study Group. (1996) *Mov. Disord.* **11**, 136-142
65. Bonelli, R.M. y Wenning, G.K. (2006) *Curr. Pharm. Des.* **12**, 2701-2720
66. Browne, S.E., Ferrante, R.J. y Beal, M.F. (1999) *Brain. Pathol.* **9**, 147-163
67. Tabrizi, S.J., Cleeter, M.W., Xuereb, J., Taanmman, J.W., Cooper, J.M., Schapira, A.H. (1999) *Ann. Neurol.* **45**, 25-32
68. Polidori, M.C., Mecocci, P., Browne, S.E., Senin, U. y Beal, M.F. (1999) *Neurosci. Lett.* **272**, 53-56
69. Tabrizi, S.J., Workman, J., Hart, P.E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G., Cooper, J.M. y Schapira, A.H. (2000) *Ann. Neurol.* **47**, 80-86
70. Friedlander, R.M. (2003) *New. Engl. J. Med.* **348**, 1365-1375
71. Cha, J.H. (2000) *Trends. Neurosci.* **23**, 387-392
72. Luthi-Carter, R., Apostol, B.L., Dunah, A.W., et al. (2003) *Neurobiol. Dis.* **14**, 624-636
73. Ginsberg, M.D., Becker, D.A., Busto, R., Belayev, A., Zhang, Y., Khoutorova, L., Ley, J.J., Zhao, W. y Belayev, L. (2003) *Ann. Neurol.* **54**, 330-342
74. Kahlem, P., Green, H. y Djian, P. (1998) *Mol. Cell.* **1**, 595-601
75. Zadori, D., Klivenyi, P., Vamos, E., Fulop, F., Toldi, J. y Vecsei L. (2009) *J. Neural. Transm.* **116**, 1403-9
76. Perez-Severiano, F., Rios, C. y Segovia, J. (2000) *Brain. Res.* **862**, 234-237
77. Bogdanov, M.B., Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Ferrante, R.J. y Beal, M.F. (2001) *J. Neurochem.* **79**, 1246-1249
78. Roze, E., Saudou, F. y Caboche, J. (2008) *Curr. Opin. Neurol.* **21**, 497-503
79. Traynelis, S.F. y Cull-Candy, S.G. (1991) *J. Physiol.* **433**, 727-763
80. Martínez-Lazcano, J.C. (2010). *Tesis de doctorado. ENCB-IPN.* D.F. México

Semblanza de la Dra. Francisca Pérez-Severiano



Francisca Pérez Severiano, nació en Soltepec, Puebla en 1969. En 1993 obtuvo el grado de Químico Farmacobiólogo en la Facultad de Ciencias Químicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Realizó su tesis de Licenciatura en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM. En 1996 obtuvo su grado de Maestra en Ciencias, especialidad en Farmacología en el Departamento de Farmacología y Toxicología. CINVESTAV-IPN. En 1997 realizó una estancia de intercambio académico en la República Checa en Praga en el Instituto de Fisiología. Posteriormente realizó sus estudios de

Doctorado y en el 2003, obtuvo el grado de Doctora en Ciencias, especialidad en Neurobiología Celular y Molecular en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-IPN. Desde 1996 se integró al Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía como ayudante de Investigador y a la par fue profesora de asignatura de Farmacología General en la Facultad de Química de la UNAM. Actualmente tiene el cargo de Investigadora en Ciencias Médicas "D" en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y realiza sus investigaciones básicas en la línea de estudio del daño oxidativo en enfermedades neurodegenerativas y búsqueda de terapias en modelos experimentales, principalmente en la enfermedad de Huntington. Además como investigador joven le fue otorgado por CONACyT un apoyo para el estudio del efecto del probenecid en el modelo de la enfermedad de Huntington en un modelo inducido por ácido quinolínico. A la fecha cuenta con 29 publicaciones en revistas internacionales y con 6 capítulos de libros. Desde 1998 es miembro del Sistema Nacional de Investigadores, nivel 2 y es miembro activo de la Society for Neuroscience y de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 61-72. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

ESTABILIDAD CINÉTICA DE PROTEÍNAS

Andrea Gutiérrez-Quezada y Miguel Costas

Laboratorio de Biofísicoquímica, Departamento de Físicoquímica,
Facultad de Química, UNAM. Cd. Universitaria, México D.F. 04510
andreatgzq@gmail.com y costasmi@servidor.unam.mx

Resumen

*La estabilidad de las proteínas tiene tanto aspectos termodinámicos como aspectos cinéticos. En este trabajo se presentan de manera breve y general los aspectos cinéticos de la estabilidad, haciendo énfasis en su determinación experimental utilizando la calorimetría diferencial de barrido. Se discuten los casos de la lipasa de *T. lanuginosa* y varias mutantes, y de la triosafosfato isomerasa de algunos parásitos protozoarios. La primera se encuentra entre las enzimas con mayor número de aplicaciones biotecnológicas y la segunda es una proteína blanco de un posible fármaco contra varias enfermedades parasitarias. En el estudio de la lipasa se demostró que el método de evolución dirigida permite obtener variantes funcionales que presentan una mayor estabilidad cinética que la enzima silvestre. Los resultados con la triosafosfato isomerasa mostraron que proteínas que comparten la misma estructura y función, pero pertenecen a distintos organismos, tienen estabilidades cinéticas muy diferentes, posiblemente como resultado de una presión evolutiva selectiva.*

Palabras clave: Estabilidad cinética, calorimetría diferencial de barrido, barreras de solvatación, lipasa, triosafosfato isomerasa.

Abstract

*Protein stability has thermodynamic and kinetic aspects. In this work, kinetic stability is discussed in a brief and general manner, emphasizing its experimental determination using differential scanning calorimetry. The cases of lipase from *T. lanuginosa* and several mutants, and of triosephosphate isomerase from three different parasitic protozoa are discussed. The first is amongst the proteins with most biotechnological applications, while the second has been used as a target for drug design against several parasitic diseases. In the study concerning lipase, it was shown that using directed evolution methods it is possible to obtain variants that show a higher kinetic stability than the wild type. The results for the triosephosphate isomerases showed that proteins sharing the same structure and function but belonging to different organisms have very different kinetic stabilities, possibly as a result of the selection pressure*

Keywords: Kinetic stability, differential scanning calorimetry, solvation barriers, lipase, triosephosphate isomerase.

1. Estabilidad termodinámica y estabilidad cinética

En la estabilidad de las proteínas están involucrados tanto aspectos termodinámicos como aspectos cinéticos [1]. Una proteína es termodinámicamente estable cuando el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) para el proceso de desnaturalización es positivo y por tanto, desfavorable. Así, cuando en una proteína se cumple que $\Delta G > 0$, a ciertas condiciones de temperatura, presión, concentración y pH se dice que la proteína es estable, lo que permite estudiarla *in vitro* desde muy diversos puntos de vista. Sin embargo, esta estabilidad termodinámica no garantiza que la proteína permanecerá en el estado nativo (es decir, en el estado biológicamente funcional) por un tiempo ilimitado. Ello se debe a que las proteínas en el estado nativo sufren alteraciones irreversibles que “vacían” ese estado de manera dependiente del tiempo. Es decir, la estabilidad de la proteína tiene también aspectos cinéticos.

En este contexto, es interesante señalar que muchas de las acciones que realizamos para conservar a una proteína en el estado nativo y poder entonces estudiarla (e.g. la búsqueda del amortiguador y el pH adecuados, la conservación mediante la precipitación con sulfato de amonio, mantenerla a bajas temperaturas, etcétera) tienen, de hecho, el propósito de reducir la cinética de desnaturalización, de tal manera que el estado nativo se mantenga significativamente poblado por un período de tiempo que permita hacer experimentos con ella. Cuando una proteína permanece en el estado nativo funcional por un período de tiempo largo, se dice que es cinéticamente estable.

La estabilidad cinética de las proteínas y los factores que la determinan han sido objeto de investigaciones detalladas sólo durante los últimos 15 años, cuando las técnicas empleadas para su estudio y los modelos usados para la interpretación de la información experimental se desarrollaron lo suficientemente como para permitirlos. Los trabajos reportados durante estos años indican claramente que la estabilidad cinética juega un papel relevante. Algunos ejemplos son los siguientes: (a) se han encontrado evidencias de que la existencia de las barreras de activación (ver sección 4) que determinan la estabilidad cinética de una proteína tienen su origen en una presión evolutiva selectiva, en respuesta a sus requerimientos biológicos. Un ejemplo lo encontramos en el mecanismo empleado por algunas proteasas bacterianas, que presentan una estabilidad cinética significativa [2]; (b) se sabe que algunas enfermedades están asociadas con

el mal plegamiento de algunas proteínas, que tienen como consecuencia la formación irreversible de un estado no nativo, por ejemplo, amiloides. Un amiloide es el resultado de una conversión de proteínas o fragmentos de proteínas desde sus formas nativas, a estados agregados en forma de fibrillas o placas, que se acumulan en diversos órganos y dan origen a más de 20 enfermedades diferentes. Una posible estrategia para inhibir la formación de amiloides consiste en incrementar la estabilidad cinética del estado nativo de las proteínas que los forman [3-5]; (c) se ha demostrado que la estabilidad de muchos sistemas complejos de interés tiene una faceta cinética [6-14]; y (d) muchas aplicaciones biotecnológicas de toda índole requieren incrementar la estabilidad cinética de las proteínas involucradas en ellas [15].

2. Calorimetría diferencial de barrido

Los estudios de desnaturalización térmica de proteínas, realizados mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) han sido de utilidad para comprender la estabilidad de las proteínas y la energética detrás de los procesos involucrados. En los equipos de DSC se tienen dos celdas (la de trabajo y la de referencia) que se calientan a una velocidad constante proporcionando la cantidad de energía necesaria para mantener entre ellas una mínima diferencia de temperatura (dT). Dado que a presión constante la energía es igual a la entalpía, el DSC mide la capacidad calorífica a presión constante $C_p = dH/dT$ de la muestra. La Figura 1 muestra esquemáticamente las curvas de C_p vs. T (denominadas trazas calorimétricas) cuando ambas celdas están llenas con amortiguador y cuando en la celda de trabajo se ha colocado una proteína.

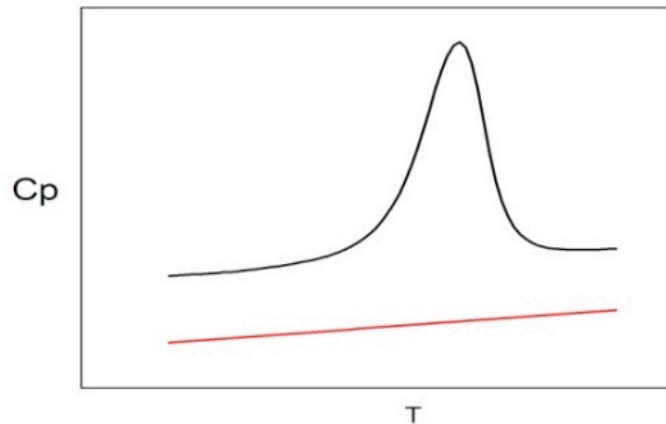


Figura 1. Trazas calorimétricas obtenidas en un equipo de DSC cuando las celdas de trabajo y de referencia contienen un amortiguador (traza roja) y cuando la celda de trabajo contiene una proteína (traza negra).

El intervalo de temperatura en el cual ocurre la transición del estado nativo al desnaturalizado (o agregados), la temperatura a la cual se observa un máximo en la traza (T_m), el área bajo la curva, su ancho y su perfil (simetría/asimetría) son diferentes para cada proteína. Son, para expresarlo coloquialmente, la firma térmica de una proteína. En el intervalo de temperatura donde ocurre la transición, la población de proteína en los estados nativo y desnaturalizado van cambiando, es decir, mientras que al inicio de la traza la mayor parte de las proteínas se encuentran en el estado nativo y sólo algunas se han desnaturalizado, al final de la curva ocurre lo contrario. Si la transición es de dos estados (sin intermediarios), T_m es la temperatura a la cual ambas poblaciones son iguales. El área bajo la curva, por otra parte, es la

energía o entalpía total necesaria para transformar toda la población de proteínas originalmente en el estado nativo al desnaturalizado.

3. Caracterización de la estabilidad cinética de las proteínas

La evidencia más clara del control cinético de la estabilidad de las proteínas la proporciona la calorimetría diferencial de barrido al estudiar la desnaturalización térmica (frecuentemente irreversible) de proteínas empleando varias velocidades de barrido, es decir, diferentes velocidades de calentamiento.

La señal inequívoca de que la estabilidad de una proteína está cinéticamente controlada es que las trazas calorimétricas sean altamente dependientes de la velocidad de barrido. La Figura 2 muestra un ejemplo de esta dependencia para la triosafosfato isomerasa de *Typanosoma cruzi* (TcTIM) [16]. En esta figura puede observarse que al aumentar la velocidad de barrido, el intervalo en el cual ocurre la transición y la T_m se desplazan a temperaturas mayores, mientras que el área bajo las trazas permanece constante.

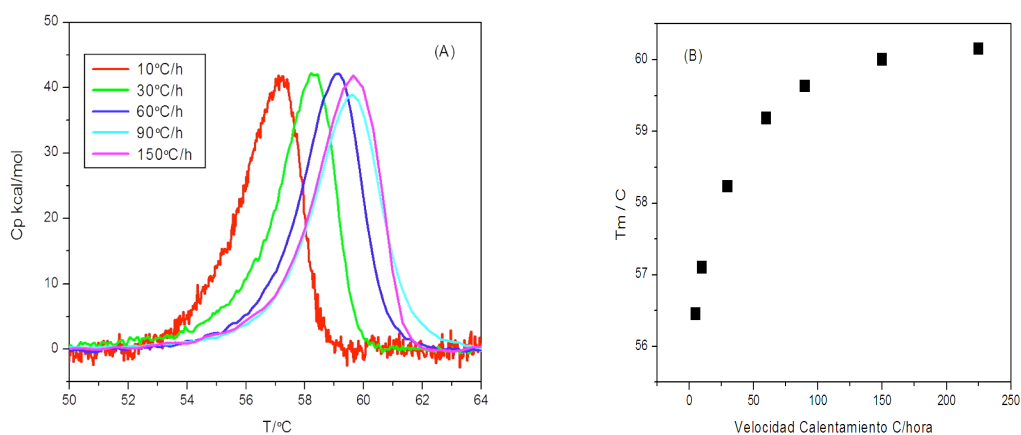


Figura 2. (A) Trazas calorimétricas para la triosafosfato isomerasa de *Typanosoma cruzi* (TcTIM) a las velocidades de calentamiento indicadas; (B) variación de la T_m con la velocidad de calentamiento. Diagrama tomado de la referencia [16].

4. Barreras de solvatación

En cualquier reacción química, una barrera de energía -conocida también como energía de activación- separa los reactivos y los productos. Al colisionar las moléculas de los reactivos deben tener la energía suficiente para vencer esa barrera, a fin de que se formen los productos. Una situación análoga se presenta para el proceso de desnaturalización de una proteína. Es decir, el control cinético de la transformación del estado nativo al desnaturalizado queda caracterizado por una barrera energética. Algunos trabajos teóricos [17-19] sugieren que, en el caso de las proteínas, las barreras energéticas son barreras de solvatación. La Figura 3 ilustra esquemáticamente como pueden conceptualizarse estas barreras. En el proceso que lleva a la proteína desde el estado nativo (N) al desnaturalizado (U) existe un estado de transición (TS). Para que las proteínas en el estado N lleguen al estado TS deben vencer una barrera de solvatación. De igual manera en la dirección del plegamiento, para que las proteínas en el estado U lleguen al estado TS es necesario también superar una barrera que, en este caso, se denomina de de-solvatación. En la dirección de la desnaturalización, el estado de transición TS

se conceptualiza como aquel donde existen dos tipos de regiones, a saber (1) regiones de la proteína que ya están desplegadas (expuestas al disolvente) y (2) regiones en las cuales las interacciones débiles entre residuos están rotas (o parcialmente rotas) y los residuos involucrados aun no están expuestos al disolvente.

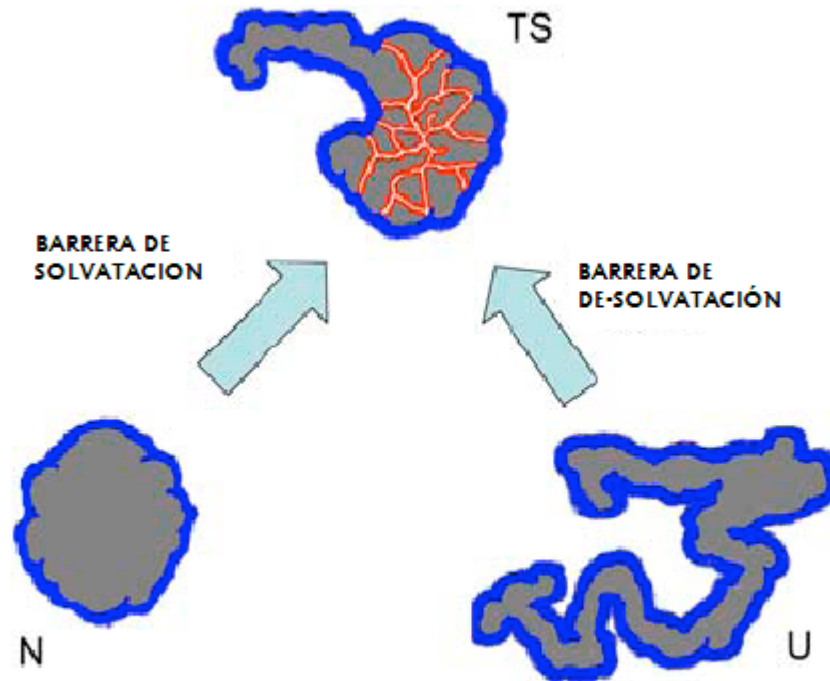


Figura 3. Representación esquemática de las barreras de solvatación y de de-solvatación en los procesos de desnaturalización y plegamiento, respectivamente. El color azul en los estados nativo (N), de transición (TS) y desplegado (U) representa las superficies expuestas al disolvente. En el estado de transición TS, el color rojo representa a los contactos internos residuo-residuo rotos (o parcialmente rotos) que aun no están expuestos al disolvente. Diagrama tomado de la referencia [19].

En términos simples, la barrera de solvatación surge de la asincronía (es decir, la no simultaneidad) entre la penetración de moléculas de agua y la ruptura de contactos internos entre residuos. Simétricamente, la barrera de de-solvatación es debida a la asincronía entre la salida de moléculas de agua y la formación de contactos internos entre residuos.

5. Energía de activación y el modelo de dos estados irreversible.

Para obtener la energía de activación de la barrera de solvatación es necesario plantear un modelo que explique el proceso de desnaturalización. Este modelo debe ser capaz de describir adecuadamente las trazas calorimétricas como las que se muestran en la Figura 2. Para muchas proteínas, la desnaturalización sigue el modelo conocido como “dos estados irreversible” [20]. En él se plantea que la transformación que ocurre al calentar la proteína es $N \rightarrow F$, donde N es el estado nativo y F el estado final que se caracteriza por ser incapaz de regresar al estado nativo (de ahí la denominación de irreversible). En el estado F las proteínas están desplegadas o formando agregados.

Experimentalmente, la irreversibilidad del proceso se comprueba cuando al realizar en el equipo de DSC un ciclo de calentamiento-enfriamiento-calentamiento en una misma muestra, no se observa pico o traza calorimétrica al efectuar el segundo calentamiento. El modelo plantea que la cinética de la transformación $N \rightarrow F$ queda descrita por una constante de velocidad (k) de primer orden, cuya dependencia con la temperatura está dada por la ecuación de Arrhenius:

$$k = \exp \left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*} \right) \right]$$

donde E_A es la energía de activación y T^* es la temperatura a la cual la constante de velocidad es igual a 1 min^{-1} . En el modelo, la traza calorimétrica está dada por

$$Cp = \frac{E_A \Delta H}{RT^{*2}} \exp \left(\frac{E_A(T - T^*)}{RT^{*2}} \right) \exp \left(-\exp \left(\frac{E_A(T - T^*)}{RT^{*2}} \right) \right)$$

donde ΔH es el cambio de entalpía asociado a la desnaturalización. El ajuste de esta ecuación a trazas calorimétricas obtenidas a varias velocidades de barrido en el DSC proporciona los valores de E_A , ΔH y T^* . Dos formas de verificar que el modelo de dos estados irreversible describe correctamente la cinética de desnaturalización de una proteína dada son: (i) que los valores de E_A , ΔH y T^* obtenidos de los ajustes sean los mismos a todas las velocidades de barrido empleadas en los experimentos de DSC y (ii) que, de acuerdo con la ecuación de Arrhenius, una gráfica de $\ln k$ v.s. $1/T$ sea una línea recta (conocida como la gráfica de Arrhenius). Es interesante señalar que en el modelo hay una relación simple entre el ancho del pico (ap) y la E_A , a saber:

$$ap = 2.45 \frac{RTm^2}{E_A}$$

Así, la simple comparación visual entre los picos de dos proteínas ya indica cuál de ellas tiene una E_A mayor.

6. Lipasa de *Thermomyces lanuginosa*

Las lipasas se encuentran entre las enzimas con mayor número de aplicaciones biotecnológicas. Un estudio calorimétrico [21] llevado a cabo con la lipasa silvestre de *Thermomyces lanuginosa*, con cuatro variantes de la silvestre que presentan mutaciones puntuales y dos variantes con mutaciones múltiples, reveló que el proceso de desnaturalización para estas enzimas está cinéticamente controlado, y que puede ajustarse al modelo de dos estados irreversible (figura 4).

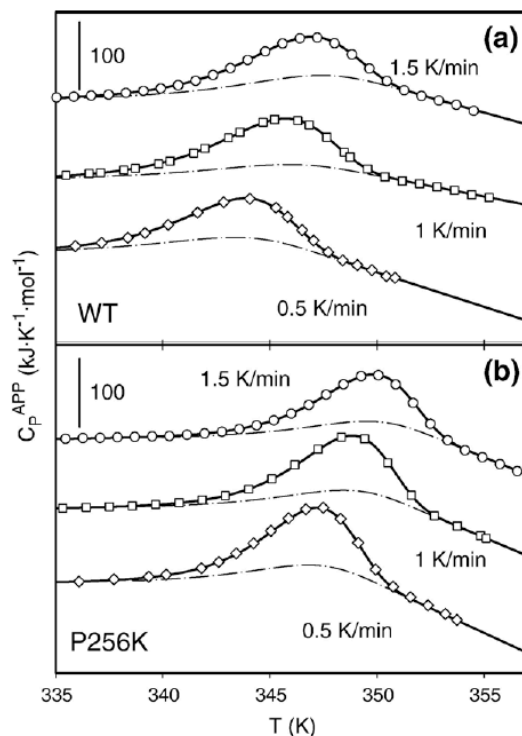


Figura 4. Ajuste al modelo de dos estados irreversible (línea continua) a las trazas calorimétricas (símbolos) obtenidas para la lipasa silvestre de *T. lanuginosa* y para la mutante P256K. Estas trazas, así como las de las demás variantes estudiadas, son irreversibles y muestran dependencia por la velocidad de barrido, lo que indica que el proceso está cinéticamente controlado. La concentración de proteína en todos los casos fue de 0.1 mg/mL. Diagrama tomado de la referencia [21].

La constante de velocidad para el proceso de destanuralización, k , es de primer orden, según asume el modelo y está descrito por la ecuación de Arrhenius, tal y como lo muestra la linealidad del gráfico de $1/T$ vs. $\ln k$ (figura 5).

A partir de la ecuación de Arrhenius y utilizando la teoría del estado de transición (que asume la existencia de un estado de transición, cuya concentración con respecto al estado inicial y final es, en cualquier punto del proceso, despreciable) es posible calcular la energía libre de activación, que es la diferencia de energía entre el estado de transición y el estado nativo de la proteína. La figura 6 muestra el efecto de las diferentes mutaciones sobre la energía libre de activación, en función del efecto sobre la entalpía de activación, que para el modelo del estado de transición es igual al valor de la energía de activación E_A . El hecho de que las mutantes múltiples muestren una mayor diferencia en la energía libre de activación, tiene una implicación directa en la estabilidad cinética de las mismas: dada la mayor energía que se requiere para llegar al estado de transición, este estado es menos accesible, lo que confiere al estado nativo N de las mutantes múltiples una mayor estabilidad. Esta estabilidad es, de hecho, de naturaleza cinética. Por último se concluye en este estudio, que dicho estado de transición está separado del estado nativo mediante una barrera energética, que tiene su origen en la solvatación de los residuos internos de la proteína y por lo tanto es una barrera de solvatación.

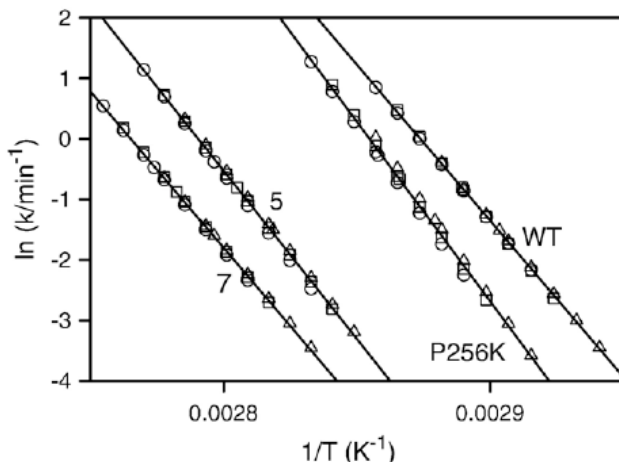


Figura 5. Gráfico de Arrhenius obtenido a diferentes velocidades de barrido para la lipasa silvestre, la mutante P256K, la mutante múltiple etiquetada como 5 (D27R/D111A/L227G/S216P/P256T) y la mutante múltiple etiquetada como 7 (D27R/G91R/N94K/D111A/S216P/L227G/P256T). Diagrama tomado de la referencia [21].

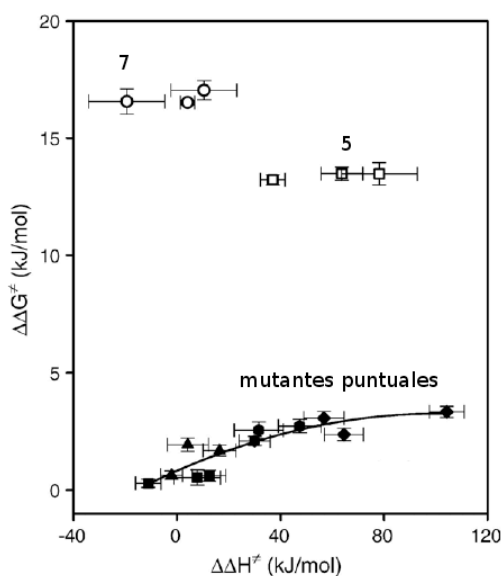


Figura 6. Efecto de las mutaciones sobre la energía libre de activación en función del efecto sobre la entalpía de activación ($\Delta\Delta X^\ddagger = \Delta X^\ddagger (\text{mutante}) - \Delta X^\ddagger (\text{silvestre})$). Las mutantes múltiples son: 5 (D27R/D111A/L227G/S216P/P256T) y 7 (D27R/G91R/N94K/D111A/S216P/L227G/P256T) Diagrama tomado de la referencia [21].

Este estudio de las lipasas demostró, entonces, que es posible obtener variantes funcionales que presentan una mayor estabilidad cinética que la enzima silvestre. En este contexto, es importante señalar que las investigaciones sobre plegamiento que comúnmente se hacen sobre enzimas de interés biotecnológico, se llevan a cabo utilizando condiciones donde se observa un equilibrio entre el estado desplegado y nativo, en el mejor de los casos o, muchas veces suponiendo *a priori* este equilibrio y por tanto partiendo de ese modelo erróneo. Sin embargo, las condiciones empleadas a nivel tecnológico comúnmente implican procesos irreversibles y un control cinético de la estabilidad.

7. Las triosafosfato isomerasas de algunos parásitos protozoarios

Un estudio comparativo de la desnaturalización térmica de las triosafosfato isomerasas de los parásitos protozoarios *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y *Leishmania mexicana* (LmTIM) realizado mediante DSC, ha demostrado grandes diferencias en cuanto a su estabilidad cinética, pese al elevado grado de identidad que guardan entre ellas [16].

La enzima triosafosfato isomerasa es de interés desde el punto de vista farmacológico, ya que diversas investigaciones han utilizado a esta enzima en particular como blanco de un posible fármaco [22,23], contra las enfermedades que causan estos tres parásitos. Los termogramas obtenidos muestran una dependencia con las diferentes velocidades de barrido empleadas y se ajustan al modelo de dos estados irreversible (figura 7).

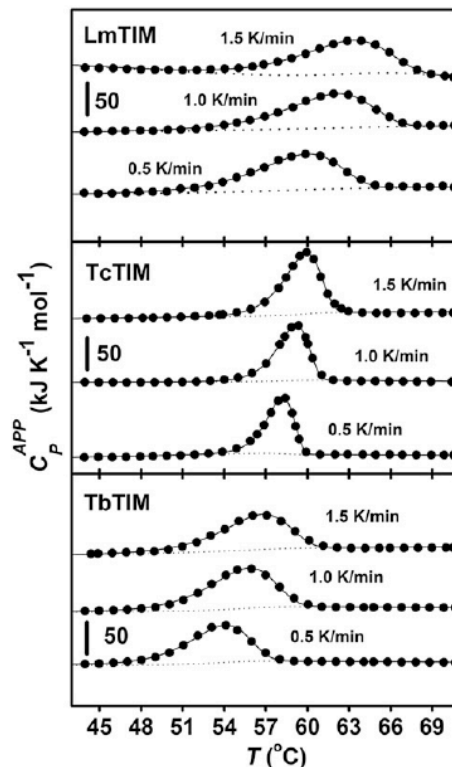


Figura 7. (A) Ajuste del modelo dos estados irreversible (línea continua) a las trazas calorimétricas experimentales (símbolos) obtenidas con un equipo DSC para TbTIM, TcTIM y LmTIM, a diferentes velocidades de barrido. La concentración de proteína en todos los casos es de 0.4 mg/mL. Diagrama tomado de la referencia [16].

En la figura 7 se puede observar que el ancho de la traza para la enzima TcTIM es menor que para TbTIM y LmTIM. Tal y como se explicó en la sección 5, esto indica que la energía de activación de TcTIM es mayor que para las otras dos proteínas. Esto se comprueba trazando un gráfico de Arrhenius (figura 8), que es consistente para todas las velocidades de barrido empleadas y que nos arrojan los siguientes valores para la energía de activación: 315 KJ mol⁻¹ para LmTIM, 398 KJ mol⁻¹ para TbTIM, y 793 KJ mol⁻¹ para TcTIM. Estos valores indican una mayor estabilidad cinética de TcTIM, en comparación con las otras dos enzimas. Este hecho se ve claramente reflejado en sus respectivos valores de la constante de velocidad de primer orden (k) para el proceso de desnaturalización a 37°C. El valor de k para LmTIM es de $3.9 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ y para TbTIM es de $7.3 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, mientras que el valor de k para TcTIM a esa misma

temperatura es de $1 \times 10^{-9} \text{ min}^{-1}$, es decir, cerca de cuatro órdenes de magnitud menor. Esto indica que, a 37°C , el proceso de desnaturalización para TcTIM es más lento y por lo tanto, ésta es cinéticamente más estable que TbTIM (recuadro de la figura 8).

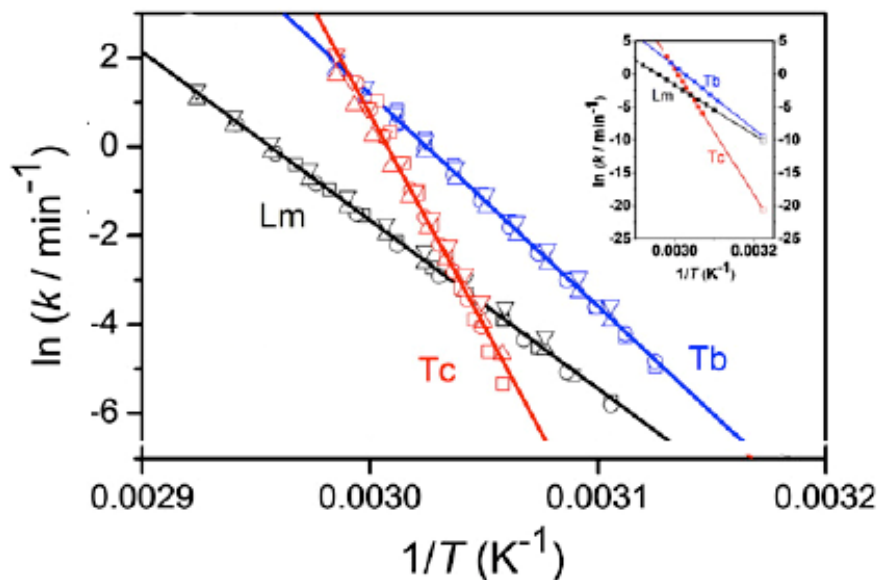


Figura 8. Gráficos de Arrhenius para la desnaturalización térmica de TcTIM, TbTIM y LmTIM, construidos a partir de los termogramas obtenidos a diferentes velocidades de barrido. En el recuadro se muestra la extrapolación de la constante de velocidad a 37°C . Diagrama tomado de la referencia [16].

En este estudio además se hace un análisis sobre la naturaleza estructural del estado de transición y la energía de la barrera de solvatación. Realizando experimentos de DSC en presencia de un desnaturalizante químico (urea), y asumiendo que el estado de transición está parcialmente desplegado, se obtienen dos contribuciones energéticas para la barrera de energía de activación (ΔG^\ddagger): la de una región de la proteína que está desplegada y solvatada (ΔG_{UNF}^\ddagger) y la de una región de la proteína cuyas interacciones nativas están rotas o parcialmente rotas pero que aún no ha sido solvatada (ΔG^*), es decir, la barrera de solvatación. Los valores de energía libre se obtienen de los respectivos valores de entalpía asumiendo una compensación entálpico-entrópica para calcular los términos de entropía y suponiendo que todos estos términos son independientes de la temperatura. Los resultados se muestran en la figura 9, en la que se ve claramente que el valor de la barrera de activación está determinada principalmente por el valor de la barrera de solvatación.

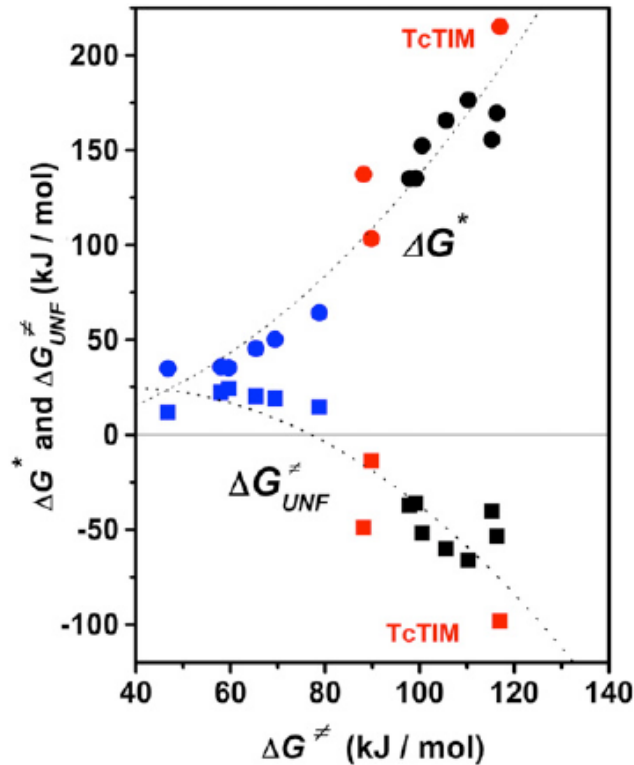


Figura 9. Las contribuciones del desplegamiento ($\Delta G_{UNF}^{\ddagger}$) y de la barrera de solvatación (ΔG^{\ddagger}), a la energía del estado de transición ($\Delta G^{\ddagger} = \Delta G_{UNF}^{\ddagger} + \Delta G^{\ddagger}$). Las tres TIMs estudiadas se muestran en rojo. Para propósitos ilustrativos se muestran también los resultados obtenidos para las lipasas de *T. languinusa* y para una serie de proteínas de bajo peso molecular. Las líneas puntuadas se presentan sólo como ayuda visual. Diagrama tomado de la referencia [16].

Lo destacable de estos resultados, como ya se mencionó, es la gran diferencia encontrada entre TcTIM y las otras dos TIMs en cuanto a su estabilidad cinética, como se puede deducir de las constantes de velocidad para el proceso de desnaturalización, así como de los valores de las energías de activación. Esto sugiere que existe una presión evolutiva sobre proteínas análogas, que las lleva a modular su estabilidad cinética según su función biológica en términos de su barrera de solvatación.

Referencias

1. Baker, D. y Agard, D.A. (1994) *Biochemistry* **33**, 7505-7509
2. Jaswal, S.S., Truhlar, S.M., Dill, K.A. y Agard, D.A. (2005) *J. Mol. Biol.* **347**, 355-366
3. Hammarstrom, P., Wiseman, R.L., Powers, E.T. y Kelly, J.W. (2003) *Science* **299**, 713-716
4. Petrassi, M.M., Johnson, S.M., Purkey, H.E., Chiang, K.P., Walkup, T. y Jinag, X. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 6662-6671
5. Wiseman, R.L., Johnson, S.M., Keller, M.S., Foss, T., Wilson, I.A. y Kelly, J.W. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5540-5541
6. Schnyrov, V.L., Zhadan, G.G., Cobaleda, C., Muñoz-Barroso, I. y Villar, E. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **341**, 89-97
7. Sohl, J.L., Jaswal, S.S. y Agard, D.A. (1998) *Nature* **395**, 817-819
8. Jaswal, S.S., Sohl, J.L., Dans, J.H. y Agard, D.A. (2002) *Nature*, **415**, 343-346

9. Leikina, E., Merts, M.V., Kuznetsova, N. y Leikin, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1314-1318
10. Persikov, A.V. y Brodsky, B. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1101-1103
11. Lynch, S.M., Boswell, S.A. y Colon, W. (2004) *Biochemistry* **43**, 16525-16531
12. Manning, M. y Colon, W. (2004) *Biochemistry* **43**, 11248-11254
13. Forrer, P., Chang, C., Ott, D., Wlodawer, A. y Pluckthun, A. (2004) *J. Mol. Biol.* **344**, 179-193
14. Jayaraman, S., Gantz, D. y Gursky, O. (2005) *Biochemistry* **44**, 3965-3971
15. Kirk, O., Borchert, T.V. y Fuglsang, C.C. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 345-351
16. Costas, M., Rodríguez-Larrea, D., de Maria, L., Borchert, T.V., Gomez-Puyou, A. y Sanchez-Ruiz, J.M. (2008) *J. Mol. Biol.* **360**, 715-724
17. Rank, J.A. y Baker, D. (1997) *Protein Sci.* **6**, 347-354
18. Cheung, S.M., García, A. E. y Onuchic, J.N. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 685-690
19. Liu, Z. y Chan, H.S. (2005) *J. Mol. Biol.* **349**, 872-889
20. Sánchez-Ruiz, J.M. (1992) *Biophys. J.* **61**, 921-935
21. Rodríguez-Larrea, D., Minning, S., Borchert, T.V. y Sánchez-Ruiz, J.M. (2006) *J. Mol. Biol.* **360**, 715-724
22. Gómez-Puyou A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A. y Pérez-Montfort, R. (1995) *Chem & Biol.* **2**, 847-855
23. Téllez-Valencia A., Olivares-Illana, V., Hernández-Santoyo, A., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., López-Calahorra, F., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (2004) *J. Mol. Biol.* **341**, 1355-1365

Semblanza del Dr. Miguel Costas



Cursó la carrera de Ingeniería Química (1970-1975) y la Maestría en Físicoquímica (1976-1979) en la Facultad de Química de la UNAM. Realizó el Doctorado en Química (1980-1984) en la Universidad de McGill en Montreal, Canadá, donde también hizo una estancia posdoctoral (1985-1986). Se incorporó como profesor-investigador de tiempo completo en la Facultad de Química de la UNAM en 1987. Actualmente es nivel 3 en el SNI y nivel D en el PRIDE de la UNAM. A la fecha cuenta con 95 publicaciones en revistas científicas internacionales con más de 1300 citas. Fue galardonado con el D.W. Ambridge Award 84-85, otorgado a la mejor tesis de Doctorado en toda el área de Ciencias e Ingeniería de la Universidad de McGill en el año académico 84-85, con la Distinción Universidad Nacional para Jóvenes Académicos (DUNJA) 1990 en el área de Investigación de Ciencias Exactas y con el Premio Nacional de Química Andrés Manuel del Río en Investigación (1992). Su línea de investigación es la bio-físicoquímica, que emplea los métodos experimentales y teóricos de la físicoquímica al estudio de sistemas bioquímicos. El propósito fundamental de su investigación es avanzar en el conocimiento de las bases energético estructurales que determinan las interacciones proteína-x donde x puede ser un sustrato, un inhibidor, un carbohidrato u otra proteína.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 73-84. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LOS VIRUS: ¿GENES ERRANTES O PARÁSITOS PRIMITIVOS?

Antonio Lazcano Araujo

Facultad de Ciencias, UNAM. Cd. Universitaria, México D.F. 04510
alar@ciencias.unam.mx

Resumen

Aunque ya ha transcurrido un siglo desde que Felix d'Herelle observó por primera vez los efectos de virus de insectos, seguimos sin entender el origen y la naturaleza misma de estas entidades biológicas. Al igual que varios de sus contemporáneos, D'Herelle estaba convencido de que los virus eran los representantes actuales de los primeros seres vivos, una idea que de cuando en cuando reaparece en la literatura científica. Es poco probable que ello sea cierto, ya que no es fácil explicar el origen repentino de virus primordiales dotados desde un principio de genomas capaces de codificar para polimerasas, los componentes estructurales de la cápside, y los factores que afectan la regulación de los procesos biológicos de sus hospederos. A pesar de su aparente simplicidad y de sus dimensiones extraordinariamente reducidas, los virus son el resultado de un proceso de evolución extraordinariamente sofisticado que estamos lejos de describir del todo. Por razones fáciles de comprender, solemos ver a los virus desde una perspectiva antropocéntrica que nos impide ver el papel tan extraordinario que han jugado como parte de un sistema de intercambio de material genético que, sin embargo, no ha borrado del todo las fronteras taxonómicas que separan a las especies. La disponibilidad actual de técnicas moleculares y el desarrollo de perspectivas epidemiológicas más amplias ha permitido en las últimas décadas la detección de nuevas enfermedades de origen viral. Sin embargo, los agentes causales son meras variantes de tipos virales preexistentes, lo que sugiere que la diversidad viral actual es el resultado de la diversificación de unos cuantos grupos ancestrales cuyo origen último seguimos sin comprender.

Palabras clave: Origen de la vida, naturaleza de los virus, grupos virales ancestrales.

Abstract

Almost a century after viruses were first described, the problem of their origin and ultimate nature remains unsolved. From the very beginning Felix d'Herelle became convinced that viruses could be send as the contemporary representatives of the first living beings, an idea which was independently suggested by a number of authors and which still finds its way in some contemporary assessments. This is very unlikely. There is a very small likelihood that the ancestors of extant viruses could have evolved abiotically already endowed with genes encoding for a number of traits like replication, capsid structural components and regulatory factors affecting their hosts. In spite of their small size, highly compacted genome and other traits, viral characteristics reflect a complex, sophisticated evolutionary process which we are far from understanding. Anthropocentric biases that are easy to explain have limited our understanding of viruses as part of a dynamic and intense gene traffic that connects many species but has not erased altogether the taxonomic barriers separating living beings. Contemporary molecular tools and broader epidemiological perspectives allow the detection of new viral diseases affecting new hosts, but these pathogens are mere variants of pre-existing viral groups, suggesting extant viral diversity can be explained as arising from relatively few starter groups.

Keywords: Origin of life, primordial viruses, starter groups, viral nature.

Introducción

Aunque Felix D'Herelle fracasó como empresario chocolatero, su extraordinaria habilidad experimental y su formación autodidacta en microbiología le permitieron recorrer Europa, Turquía, Indochina, la India, Egipto, los EEUU, Canadá, Latinoamérica y en la URSS, recogiendo muestras, aislando bacterias, produciendo vacunas, analizando excrementos de vacas, pollos, humanos e insectos e intentando purificar con métodos no tan convencionales aguas de origen incierto. Como era un aventurero incansable, en 1907 abandonó su empleo en un hospital en Guatemala (en donde, además de trabajar como bacteriólogo, inventó de pasada una bebida alcohólica que llamó "mon banana whisky") y brincó la frontera hacia México, en donde Olegario Molina, a la sazón ministro de Fomento de Don Porfirio Díaz, lo contrató para estudiar los procesos microbiológicos asociados con la industrialización del henequén.

En 1910, cuando D'Herelle ya disponía de un laboratorio que había montado en una de las haciendas de Molina, los cultivos fueron atacados por una plaga de langostas. Cuando recorría los campos, un grupo de campesinos mayas le hizo notar que había zonas en donde los insectos, luego de haber devorado las plantas, morían rápidamente. Sin conmiseración alguna, D'Herelle recogió langostas agonizantes y les practicó autopsias prematuras para tratar de entender de que morían. Los insectos, escribió años más tarde, padecían diarreas provocadas por grandes cantidades de bacilos, que pudo aislar y cultivar en el laboratorio sin problema alguno. No tardó en observar lo que llamó una "anomalía", y que consistía en "manchas claras, de forma casi circular, de dos o tres milímetros en diámetro, que afectaban varias de las colonias que crecían en agar". Al investigar el origen de las manchas D'Hérelle se percató, para su sorpresa, que eran producidas por un agente infeccioso tan minúsculo que podía atravesar sin problema alguno los filtros de porcelana que frenaban el paso de bacterias y otros microorganismos.

D'Herelle no tardó en abandonar México, pero nunca olvidó lo que había observado en Yucatán. En 1915 se encontraba en París, y al estudiar la epidemia de disentería que estaba causando estragos en el ejército francés, observó placas en los cultivos de Shigella y recordó con una precisión envidiable lo que había visto años atrás en una hacienda yucateca. Convencido de que tenía a su alcance una forma de destruir patógenos microbianos, tomó material de las placas, y lo agregó a un cultivo de Shigella. "A la mañana siguiente", escribió D'Herelle años después, "abrí el incubador y experimenté uno de esos momentos de intensa emoción que recompensan todos los esfuerzos del investigador: pude observar de inmediato la perfecta limpidez del cultivo que la noche anterior se encontraba muy turbio: todas las bacterias se habían desvanecido, como se disuelve un trozo de azúcar en agua. Cuando examiné las que cultivaba en agar, ví que la colonia no había crecido y lo que me sobrecogió de emoción fue el haber comprendido de inmediato lo que había ocurrido: lo que causaba las manchas claras, las placas que yo había observado, no era otra cosa que un microbio invisible, un virus filtrable, pero un virus que es un parásito de las bacterias".

D'Herelle no fue el primero en utilizar el término "virus". Como escribe Smith Hughes [1], durante la segunda mitad del siglo XIX el término "virus", que es una palabra latina que significa veneno o sustancia pestilente, circulaba entre médicos y pacientes para referirse en forma genérica a cualquier agente infeccioso de dimensiones microscópicas. En 1892 Dimitri Iosofovich Ivanowsky, un estudiante de la Universidad de San Petesburgo que había estado estudiando el llamado mosaico del tabaco, que afectaba las plantaciones de Crimea, descubrió que el agente causante de la infección podía atravesar los filtros que frenaban a las bacterias, pero a diferencia de D'Herelle pensó que se trataba de una toxina bacteriana. Era imposible conocer su naturaleza exacta, y por ello no fue sino varios años más tarde cuando Martinus Beijerinck, un destacado microbiólogo holandés, confirmó los resultados de Ivanowsky y llamó al patógeno "líquido viviente contagioso", y comenzó a popularizar el uso de la palabra virus.

El origen de los virus: la perspectiva histórica

Felix D'Hérelle publicó los resultados de sus experimentos en 1917, pero para entonces Frederick Twort, un microbiólogo inglés, ya había dado a conocer sus propias observaciones sobre los virus. A diferencia de otros, Twort y D'Herelle estaban convencidos de que los virus no eran una toxinas líquidas, sino partículas submicroscópicas capaces de multiplicarse. Impertérrito, D'Herelle fue más lejos; aunque todo indica que conocía el trabajo de Twort, decidió ignorarlo y en 1918 acuñó el término "bacteriófago", un neologismo que ha corrido con enorme fortuna, y llegó a la conclusión de que el tamaño minúsculo de los virus no solamente los colocaba en la frontera entre lo vivo y lo inerte, sino que correspondían a las primeras formas de vida que surgieron en nuestro planeta.

Los descubrimientos de D'Herelle tuvieron una influencia considerable, y no tardaron en encontrar acomodo en las ideas sobre la genética que se estaban desarrollando con rapidez. En 1922 el genetista Hermann J. Muller [2], que se había incorporado al grupo de Thomas Hunt Morgan en la Universidad de Columbia, afirmó que los bacteriófagos no eran organismos sino genes, cuya naturaleza química nadie conocía aunque se sabía que residían en los cromosomas. "Sería excesivo identificar a los corpúsculos [de D'Herelle] con los genes", escribió Muller, "pero en este momento no hay que confesar que no parece existir ninguna diferencia entre ambos".

Estas ideas no tardaron en extenderse a las discusiones sobre la aparición de la vida. En 1928 John B. S. Haldane publicó un breve ensayo en donde examinaba la cuestión del origen de la vida y, en forma independiente a como lo había hecho A. I. Oparin unos cuantos años atrás, propuso también la idea de que los primeros organismos eran resultado de un proceso de evolución que había comenzado con la síntesis abiótica de compuestos orgánicos y la formación de la llamada sopa primitiva, hasta llegar a la aparición de los primeros organismos, que supuso

eran procariontes anaerobios y heterótrofos. Sin embargo, sugirió que los virus representaban una forma intermedia entre las moléculas de la sopa primitiva y las primeras formas de vida. Hoy sabemos que no es así. Ningún virus puede proliferar en ausencia de sus hospederos celulares, lo que implica que ninguno de ellos pudo surgir antes de que aparecieran las primeras células.

Aunque D'Herelle no podía explicar a ciencia cierta la naturaleza química de los virus, comprendió de inmediato que aunque no eran producidos por las bacterias mismas, se multiplicaban con una eficiencia excepcional en su interior. Como escribió en 1935 Robert G. Green [3], un médico estadounidense, los virus podían ser vistos como "unidades de vida", es decir, como algo vivo, únicamente cuando se encontraban en el interior de las células, "la certeza de que no existen microorganismos ultramicroscópicos de vida libre nos enfrenta al agudo problema de los límites posibles que pueden tener las formas de vida libre en un nivel que también corresponde a los límites de lo que es visible al microscopio". Green [3] no tardó en concluir que "la ausencia de microbios ultramicroscópicos es una evidencia, precisamente, del origen microbiano de los virus filtrables", y agregó que los virus, a los que como muchos otros consideraba partículas coloidales, podían ser los descendientes parasitarios de formas microscópicas ya desaparecidas o, bien, parásitos surgidos de microbios como los que aún existen en torno nuestro. Pocos años más tarde Sir Patrick P. Laidlaw analizó el origen de los virus y, para defender lo que resultó ser una hipótesis muy similar a la de Green [4] subrayó la existencia de similitudes serológicas entre virus y bacterias, la presencia de proteínas, grasas y azúcares en los virus de mayor tamaño, compiló una lista que comenzaba con los virus más pequeños, seguía con los de mayor tamaño y finalizaba con las bacterias de dimensiones más pequeñas, y analizó los experimentos que mostraban que como diversos patógenos microbianos perdían habilidades biosintéticas al crecer en medios en donde estaban presentes distintos metabolitos.

El contexto histórico en que se propusieron las ideas de Green y de Laidlaw permite comprender la rapidez con la que fueron aceptadas [5]. Al igual que los virus, las bacterias eran vistas por muchos únicamente como patógenos y, por otra parte, el percatarse que algunas de ellas como las Rickettsia y las Chlamydia eran extraordinariamente pequeñas parecía apoyar la posibilidad de que los virus fueran vistos como resultado de una "evolución retrógrada" que había llevado a la pérdida de muchos rasgos, incluyendo la posibilidad de multiplicarse de manera independiente.

Aunque muchos aceptaron lo que comenzó a ser conocida como la hipótesis Green-Laidlaw, otros comenzaron a defender la idea de que los virus pertenecían a un linaje evolutivo ajeno al resto de la biosfera que descendía, como lo habían sugerido D'Herelle y Haldane, de formas ancestrales más antiguas que las células mismas. Haciendo gala de una notable capacidad analítica y de una intuición admirable, en 1944 Frank MacFarlane Burnet [6], un inmunólogo australiano que eventualmente recibiría el Premio Nobel junto con Peter Medawar, no solamente intentó describir a los virus bajo una perspectiva ecológica y una óptica evolutiva, sino que además reconoció que existían tres tipos de explicaciones sobre el origen de los virus. Estas tres hipótesis, que según Burnet eran excluyentes entre sí, incluían (a) la posibilidad de que los virus fueran los sobrevivientes de un mundo primitivo que antecedió a las primeras células; (b) la hipótesis Green-Laidlaw, en donde los virus son vistos como los descendientes degenerados de microorganismos patógenos de dimensiones mayores y vida libre; y (c) la posibilidad de que los virus fueran fragmentos errantes de material genético de origen celular.

Taxonomía y evolución viral

Aunque el descubrimiento de los llamados mimivirus, cuyas dimensiones son mayores que las de células como los mycoplasma [7], ha venido a echar por tierra la imagen de los virus como entidades submicroscópicas, las primeras imágenes de los virus obtenidas en el siglo pasado tuvieron que aguardar el desarrollo del microscopio electrónico. En 1935, el mismo año

en que Green subrayaba que la multiplicación de los virus era un fenómeno estrictamente intracelular, Wendell Stanley y Henry Loring lograron aislar al virus del mosaico de tabaco de una planta de tomate, y lograron, para sorpresa de muchos, cristalizarlo. Esta última propiedad, unida a su tamaño minúsculo, parecía confirmar la hipótesis de que se encontraban en la frontera entre lo vivo y lo inerte. Stanley se convenció de que se trataba de un gen capaz de multiplicarse y mutar, pero era una proteína pero, siguiendo las ideas en boga, creyó que tenía un carácter proteínico. A veces es difícil superar los prejuicios científicos, y aunque un par de años más tarde Bawden y Pirie demostraron que el virus del mosaico de tabaco contenía RNA, la idea de que el material genético estuviera constituido por ácidos nucleicos aún no encontraba acomodo en el mundo científico [8].

Aunque se desconocía la naturaleza química del material hereditario, un número creciente de investigadores comenzaron a defender la idea de que los virus estaban vivos y que podían ser vistos como meros genes desnudos. El descubrimiento del papel del DNA en los procesos genéticos y el modelo de la doble hélice de Watson y Crick vinieron a reforzar el reduccionismo implícito en estos puntos de vista: el propio Wendell Stanley, por ejemplo, afirmó que los virus no solo eran equivalentes a los ácidos nucleicos, sino que estaban además vivos. Por lo tanto, concluyó Stanley, las moléculas de ácidos nucleicos están vivas –un punto de vista que coincidía con los de Herman J. Muller sobre el origen de la vida, que para entonces sostenía de manera muy audible, que los primeros organismos habían sido moléculas de DNA formadas espontáneamente en la sopa primitiva [9]. Esta idea encontraba eco entre muchos investigadores de la época, para quienes el origen viral de muchas enfermedades animales y vegetales los volvía, desde un punto de vista práctico, equivalentes a agentes infecciosos como las bacterias y los protistas y, por lo tanto, se podían considerar como vivos.

Y si los virus estaban vivos, había que buscarles un lugar en los sistemas taxonómicos tradicionales. Entre los que se empeñaron en lograrlo se encontraba C. H. Andrewes, quien comenzó a predicar la necesidad de clasificarlos, y en un trabajo titulado “Viruses y Linnaeus” propuso no solo la utilización de la nomenclatura binomial, sino también la aplicación de conceptos como especie, género, y espécimen tipo [10]. Como afirma Podolsky [4], se había llegado a una situación absolutamente contradictoria, en donde los virus eran vistos a la vez como un organismo y como una molécula “viviente”.

A decir verdad, no son ni una cosa ni otra, pero tampoco se sabía que hacer con ellos. Hasta antes de disponer de secuencias de genes y proteínas los virus eran clasificados, desde una perspectiva antropocéntrica fácil de comprender, en función de las enfermedades que provocaban, o bien en función de su morfología, lo que puede resultar un criterio extraordinariamente frágil debido a las presiones evolutivas que pueden llevar de manera polifilética hacia cápsides con formas y tamaños similares.

El tiempo y las necesidades prácticas parecen haberle dado la razón a Andrewes [10]: el llamado Internacional Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) ha hecho una labor admirable intentando sistematizar la información sobre números cada vez mayores de virus, y ha insistido en una clasificación basada, como en el caso de plantas y animales, en órdenes, familias géneros y especies [11,12]. Desde un punto de vista evolutivo, sin embargo, resulta mucho más útil reconocer que los virus se pueden dividir en dos grandes grupos, cuyos genomas pueden ser de DNA o de RNA, que pueden estar constituidos por una sola hebra o formar una doble hélice y, en el caso del RNA, puede ser hebras RNA+ o RNA- [13]. El genoma puede estar formado por varios segmentos que se replican y transcriben de manera independiente como ocurre, por ejemplo, con los virus de la influenza.

Aunque existen bacteriófagos como el llamado Q β , un virus de RNA cuya polimerasa está constituida por cuatro subunidades de las cuales tres provienen de las células de *Escherichia coli* infectadas y solo una está codificada por el genoma viral, la mayor parte de los virus codifican para su propia polimerasa –y no es fácil ni clasificarlas ni demostrar que tienen un

origen común [14]. Durante el proceso de replicación se pueden formar dobles hélices estables y, como ocurre con retrovirus como el VIH, la polimerasa es una reverso transcriptasa que forma primero una doble hélice híbrida RNA-DNA y luego, al degradar el RNA, lee la hebra complementaria de DNA formando una doble hélice que se integra en el genoma celular.

La replicación de los virus suele producir grandes poblaciones. Como ocurre con las RNA polimerasa DNA dependiente involucradas en la transcripción celular, las RNA polimerasas virales (incluyendo las RNA replicasas como la Q β replicasa o la del virus de la polio, por ejemplo) y las reverso transcriptasas carecen de actividad editora. Ello significa, por supuesto, que las poblaciones de virus, sobre todo aquellos que poseen genomas de RNA, están intrínsecamente dotadas de una enorme variabilidad genética. De hecho, la ausencia de mecanismos de edición en la replicación del RNA permite explicar el origen de los genomas divididos en segmentos que poseen algunos grupos como los ortomixovirus. Mientras mas grande sea una molécula de RNA, mayor número de mutaciones se acumularán al ser replicada mediante una polimerasa que introduce errores que no puede corregir, por lo que a la larga la identidad genética se puede perder. El genoma segmentado de virus como el de la influenza representa, por supuesto, una estrategia evolutiva que impide la acumulación desenfrenada de mutaciones. Los genomas segmentados, junto con la elevada tasa de mutaciones y la recombinación se traducen en poblaciones con una enorme diversidad fenotípica, sobre la que actúa la selección natural. Ello significa, como ha enfatizado recientemente Esteban Domingo [15], que a lo largo del tiempo evolutivo los virus no permanecen en un único nicho, sino que pueden invadir distintas especies o volver a aparecer en poblaciones en donde parecían haber desaparecido. De hecho, tengo la impresión que salvo algunos casos como el virus de la viruela, con el que hemos logrado acabar gracias a las campañas de vacunación, los virus son entidades que nunca se extinguen del todo.

Es probable que los virus sean las entidades biológicas más abundantes en la biosfera. El análisis metagenómico de 41 muestras tomadas a lo largo de unos ocho mil km del Mar de los Sargazos permitieron identificar mas de seis millones de proteínas, muchas de las cuales son de origen viral [16, 17], y las evidencias preliminares indican que existe una variedad considerable de virus de RNA marinos [18]. Sin embargo, a pesar de la enorme variedad de formas de organización de los genomas virales y de las diversas estrategias de replicación y expresión del material genético, podemos clasificar a los virus en unos cuantos grupos básicos definidos por rasgos comunes.

Es cierto que el mundo contempla atónito como aparecen repentinamente enfermedades y epidemias de origen viral como el SIDA, el SARS o, más recientemente, la influenza causada por el virus A/H1N1 –pero todas ellas son provocadas, en realidad, por variantes de grupos virales conocidos, como los retrovirus y los ortomixovirus, respectivamente. De hecho, algunos virus como el de Ebola y el de Marburgo, cuya infección suele tener efectos fulminantes, están emparentados con virus mucho más comunes, como el del sarampión y el de la rabia. Como lo ha subrayado Ed Rybicki [19], de la Universidad de Ciudad del Cabo en Sudáfrica, los llamados “módulos funcionales”, que son conjuntos de secuencias que parecen evolucionar y moverse al unísono (entre cuyos componentes las polimerasas juegan un papel central), permiten reconocer las afinidades evolutivas entre grupos de virus que no comparten ni morfología, ni tipo de genoma, ni estrategias replicativas, ni hospederos. Por ejemplo, los picornavirus, que poseen un genoma de RNA de una sola hebra e infectan animales, están relacionados con los comovirus, que son esféricos, poseen dos hebras de RNA y se replican en plantas infectadas, y con los potivirus, que también infectan plantas pero son filamentosos y pueden tener una o dos hebras de RNA. Los caudovirus, que poseen genomas de doble hélice de DNA y una cauda distintiva, se encuentran en arqueas y en bacterias.

Existen otros casos bien documentados, como el virus sindbis (SINV), que posee una membrana lipídica y una cápside icosaédrica en cuyo interior se encuentra una hebra de RNA, es transmitido por la picadura de mosquitos e infecta aves y humanos. A pesar de estas

características, el SINV en realidad está emparentado con los alfavirus, un género que incluye también a los bromoviridae, que son también icosahédricos pero poseen un genoma de tres moléculas de RNA e infectan plantas, y a los tobamovirus, el grupo al que pertenece el virus del mosaico de tabaco, que tienen forma cilíndrica y una sola hebra de RNA.

La enorme diversidad de virus de RNA probablemente refleja el éxito evolutivo tan extraordinario que han tenido al invadir y diversificarse en un nicho único en donde los virus y organismos que dependen del DNA como material genético no están presentes. A pesar de ello, la posibilidad de agrupar diversos virus en pocos géneros y familias (para usar la nomenclatura del ICTV) es, me parece, evidencia de la rareza con la que aparecen clases nuevas de virus. Aunque los mecanismos que producen nuevos tipos de virus, sobre todo de RNA, están operando constantemente, estos son en realidad variantes de los grandes grupos o, para usar la nomenclatura que algunos prefieren, existen muchas variedades de virus pero pocas especies originales de los mismos. La pregunta natural es ¿cuál es su origen?

¿Genes vagabundos?

No existe un registro paleontológico de los virus, y la reconstrucción de su historia evolutiva depende de las comparaciones de las secuencias de sus genes y proteínas. El que unos utilicen el RNA como material genético y otros el DNA no indica necesariamente que los primeros sean más antiguos que los segundos, sino que es una señal de su flexibilidad evolutiva y de la forma exitosa con la que han explotado nichos únicos. Mas aún, el estudio de los genomas virales demuestra que a lo largo de la evolución han intercambiado genes con otros virus (como lo ocurre constantemente entre los virus de la influenza) y con sus hospederos. En la mayoría de los casos los genomas virales son mosaicos minúsculos que nos permiten conocer comprender la evolución de las secuencias individuales pero no necesariamente del virus mismo.

Aunque podemos agrupar a los diferentes virus conocidos en unos cuantos grupos, no es fácil encontrar la manera que encontrar la relación evolutiva entre estos. Ello sugiere que los virus son de origen polifilético, es decir, que a lo largo de los cuatro mil millones de años de historia de la biosfera han ocurrido varios eventos independientes que han llevado a la aparición de estas grandes familias. ¿Cómo surgieron estos grupos originales? Algunos grupos, como el que incluye a los poxvirus, que incluye al virus de la viruela, están dotados de un genoma de DNA de doble hélice que codifica para unas doscientas proteínas, entre las que se incluyen los componentes de la RNA polimerasa DNA dependiente cuyas subunidades muestran una relación evolutiva con sus equivalentes celulares involucradas en la transcripción [20]. Aunque estas características hubieran parecido confirmar en su momento la validez de la hipótesis Green-Laidlaw [5], en nuestros días son pocos los que creen que los poxivirus, a pesar de su tamaño, son el resultado de un proceso de reducción de genomas celulares como los que se observan en parásitos intracelulares como los mycoplasma, las rickettsias o en organelos celulares como las mitocondrias.

Ajeno a la idea de que los virus son meros agentes patógenos, en 1957 André Lwoff [21] afirmó que "(1) el profago es un mero residuo de la degradación de una bacteria parásita o de un organismo mas o menos primitivo, o bien (2) el profago surgió de mutaciones génicas o cromosomales de una bacteria y se volvió lisogénico", y agregó, como dice Morse [5] en un tono mas o menos conciliador, "el material genético del bacteriófago y el material genético de la bacteria han evolucionado a partir de una misma estructura, el material genético de una bacteria primitiva. Cualquiera que haya sido el origen del material genético del profago, sabemos que el pro-fago se comporta como si fuera un gen bacteriano" [21].

En 1970 Howard M. Temin publicó un artículo en donde proponía lo que llamó la teoría del provirus, en donde propuso que "los virus de la leucemia no son entidades preexistentes, sino que surgen de otros elementos, los protovirus, debido a cambios genéticos" [22]. Diez años

más tarde el mismo Temin sugirió, de manera explícita, que los retrovirus se originan a partir de elementos genéticos móviles [23], formalizando así la idea de los genes errantes como origen de los virus.

La evidencia disponible apoya por completo ésta idea. La existencia de una enorme variedad de retrovirus endógenos y de retrotransposones, es decir, de entidades genéticas que codifican para reverso transcriptasas, ha sido demostrada en una gran variedad de especies, incluyendo plantas, hongos y procariontes. El análisis filogenético de las secuencias de las reverso transcriptasas ha demostrado que el dominio palm, que está involucrado en la formación del enlace 3'-5' durante la polimerización de los ácidos nucleicos, es homólogo al dominio catalítico de la DNA polimerasa I de *E. coli*, de la RNA polimerasa de fagos como T7, y de las polimerasas de hepadnavirus, que infectan a animales, y de badnavirus y caulimovirus, que infectan plantas.

Temin estaba convencido de que no solo los retrovirus habían surgido de material genético móvil, sino que éste mecanismo subyacía el origen de todos los virus. Existen evidencias que parecen apoyar esta posibilidad, sobre todo para una amplia variedad de elementos genéticos que codifican para proteínas involucradas en lo que algunos traducen como replicación por círculo rodante del DNA ("rolling circle DNA replication"), y que se ha observado en plásmidos bacterianos, en fagos con genoma de DNA de una sola hebra, en parvovirus, que infectan a insectos y mamíferos, así como patógenos de plantas como los geminivirus y los nanovirus.

Los virus de RNA: ¿vestigios de un mundo que ya se fue?

En 1953, pocas semanas después de que Watson y Crick dieron a conocer el modelo de la doble hélice del DNA, Stanley L. Miller publicó en *Science* un trabajo reportando la síntesis abiótica de aminoácidos bajo condiciones que pudieron haber existido en la Tierra primitiva. El experimento de Miller inauguró una nueva etapa en el estudio del origen de la vida, cuyo desarrollo ha reflejado, con pocas excepciones, la enorme influencia científica de la biología molecular [9]. El estudio de la aparición de la vida no tardó en dividirse en dos grandes grupos: por una parte, había muchos que, como Muller, sostenían que la vida había aparecido con el surgimiento del DNA, que se replica y almacena la información genética, pero había un grupo igualmente numeroso que sostenía que las proteínas habían aparecido primero, ya que son los catalizadores más conspicuos de los procesos bioquímicos básicos y que son indispensables para la replicación misma de los ácidos nucleicos. Aunque este debate provocó una enorme polarización científica, al comenzar la década de los 1960s muchos aceptaban la posibilidad de que el RNA fuera el material genético primitivo [9]. Hoy sabemos que probablemente fue así: el desarrollo de la genómica comparada ha permitido demostrar que la mayor parte de las secuencias más conservadas comunes a todos los genomas celulares codifican proteínas involucradas en el metabolismo del RNA, que sintetizan, degradan o se unen a ribonucleótidos y RNA, es decir, que hubo un mundo más antiguo que el DNA mismo, en donde ya habían surgido las proteínas pero los genomas eran moléculas de RNA. Esto es lo que llamamos el mundo de RNA/proteínas [24].

Hace cuarenta años Carl Woese, Francis Crick y Leslie Orgel fueron más lejos, al sugerir, de manera independiente, que antes que el DNA y que las proteínas había surgido el RNA, una molécula que hasta pocos años antes seguía siendo vista como un mero intermediario en los procesos moleculares. Para Woese, Crick y Orgel la ubicuidad de distintos tipos de moléculas de RNA y su enorme plasticidad tridimensional sugería que podría estar dotada de propiedades catalíticas. Sin embargo, muchos desdeñaban ésta posibilidad por considerarla una especulación sin fundamento. No fue sino hasta 1982 cuando los grupos de Thomas Cech y Sidney Altman descubrieron, de manera casi accidental, que el RNA poseía en efecto propiedades catalíticas. Es decir, el RNA es un ácido nucleico que puede almacenar información

genética, pero también se comporta como las proteínas y cataliza diversas reacciones bioquímicas [9].

El descubrimiento de la existencia de moléculas de RNA catalítico, también llamadas ribozimas, ha permitido conceptualizar el llamado mundo del RNA y diseñar experimentos que simulan lo que pudo haber ocurrido en la Tierra primitiva. Se han aislado ribozimas, por ejemplo, que pueden leer cadenas sencillas de RNA y forman una cadena complementaria, lo cual demuestra que en principio se podría haber obtenido la replicación del RNA en ausencia de enzimas. La caracterización de las ribozimas ha modificado en forma profunda varios conceptos de la biología molecular al demostrar, por ejemplo, que la formación del enlace peptídico que une a los aminoácidos en el interior del ribosoma es catalizada no por las proteínas ribosomales, sino por el RNA mismo.

Aunque podemos sintetizar en condiciones abióticas que pudieron haber existido en la Tierra primitiva purinas, pirimidinas y azúcares como la ribosa y la desoxirribosa, no se comprende del todo como se pudieron haber formado polirribonucleótidos en condiciones abióticas. Por otro lado, sabemos que el RNA es una molécula extraordinariamente inestable, y sus propiedades catalíticas y replicativas difícilmente pudieron haber surgido repentinamente en los mares primitivos. En realidad, no sabemos ni como ni en que condiciones surgió el mundo del RNA.

A pesar de ello, es obvio que los virus de RNA son modelos espléndidos de una etapa evolutiva posterior, cuando ya había aparecido la síntesis de proteínas y el RNA era el material genético celular. Es decir, el estudio de los virus de RNA nos permite comprender lo que ocurrió en la biosfera antes de los tres linajes celulares, es decir, las bacteria, las arquea y el ancestro del nucleocitoplasma, divergieran entre sí. Aunque no podemos afirmar que los virus de RNA provengan de estas etapas primordiales, esta es una opción que no se puede desdeñar del todo. Como escribió David Baltimore [25], es posible que los virus del RNA puedan ser vistos como vestigios de procesos que ocurrieron muy tempranamente en la evolución y que en nuestros días están restringidos a este tipo de parásitos. De hecho, Baltimore fue más lejos y sugirió la posibilidad de que la reverso transcripción que forma parte esencial del ciclo biológico de los retrovirus haya surgido al darse la transición hacia genomas de DNA. Ello implicaría, por supuesto, que los ancestros del VIH son mucho más antiguos que los eucariontes mismos.

La comparación de las propiedades físico-químicas del RNA con las del DNA desde una perspectiva evolutiva nos permite comprender, al menos en parte, los procesos que llevaron a los genomas celulares actuales [26]. Según Patrick Forterre, sin embargo, el origen del DNA no ocurrió en células primitivas, sino que se dio en entidades virales hipotéticas que surgieron en células de RNA, ya sea porque se escaparon o porque algunas de esas células se redujeron en forma drástica en un proceso comparable al que sugirieron Green y Laudlaw [27, 28]. Según Forterre, los primeros genomas de DNA evolucionaron en esas poblaciones virales ancestrales, que se podían proteger así de los mecanismos de defensa presentes en los ancestros de Bacteria, Arquea y Eucarya que invadían y en donde se multiplicaban, hasta que éstas terminaron adoptando a las moléculas de DNA como polímero informacional. Como corolario a un esquema completamente hipotético, Forterre [27] sigue insistiendo que al menos algunos de los virus de DNA conocidos provienen de esas formas ancestrales que desarrollaron nuevos tipos de genomas.

Este esquema pasa por alto no solo la ausencia de rutas biosintéticas en todos los virus que se han estudiado, sino también los mecanismos químicos que subyacen la biosíntesis de desoxirribonucleótidos, que se forman a partir de ribonucleótidos mediante una reducción enzimática que remueve el grupo OH presente en el carbono 2' de la ribosa, formando la desoxirribosa. Esta es una reacción poco favorecida desde un punto de vista termodinámico, lo que hace poco probable que haya surgido de manera polifilética. Por otro lado, Koonin [14] ha insistido en un esquema aún menos probable, al sugerir, sin tomar en cuenta las dificultades que

existen para polimerizar ribonucleótidos en condiciones abióticas y la extraordinaria inestabilidad química del RNA, que los virus provienen de un mundo precelular que evolucionó en montículos similares a los de las chimeneas que existen en algunas troneras submarinas.

Conclusiones

Los virus no están vivos, pero tampoco están muertos. Como todos saben, se replican utilizando el aparato enzimático de las células que infectan y además de mutar pueden adquirir genes de sus hospederos y transportarlos de un organismo a otro o, en muchos casos, de una especie a otra, contribuyendo así al mantenimiento de una compleja red de tráfico de información genética que ha jugado un papel esencial en la evolución, por ejemplo, de la resistencia a antibióticos. Al igual que los seres vivos, los virus también evolucionan, pero sus poblaciones se modifican y se adaptan como resultado de las presiones de los sistemas inmunológicos y otros sistemas de defensa de sus hospederos.

Desafortunadamente el estudio de los virus y la comprensión de su naturaleza está teñido por prejuicios extraordinariamente arraigados. Tanto sus dimensiones como su simplicidad estructural son criterios engañosos, y el temor que despiertan es una evidencia del sesgo con el que los vemos. Sin embargo, en su inmensa mayoría, no son patógenos y no existe un grupo biológico de donde estén ausentes. Un número importante de lo que llamamos infecciones virales emergentes en las poblaciones humanas son, en realidad, el resultado de una interacción compleja entre la evolución viral y factores de tipo socioeconómico, como la producción en masa de alimentos, la globalización y el transporte aéreo, el desarrollo de tecnologías médicas, como las transfusiones, y las invasiones a nichos ecológicos que nos exponen a los patógenos de otras especies animales [29].

Sabemos que la modificación de la información genética de los virus se da por mutación, recombinación y, en el caso de virus con genomas segmentados como los de la influenza, por intercambio de genes con otros virus que estén infectando al mismo tiempo hospederos animales de poca especificidad, como ocurre con los cerdos. En estos casos, la evolución de los virus se puede explicar como un ejemplo de puntualismo, pero al mismo tiempo sugiere que las diversas variantes del virus de la influenza y su presencia en una amplia variedad de animales sugiere que los debemos ver, como ocurre con las micobacterias, como ecotipos y no como individuos en el sentido clásico del término.

La extraordinaria capacidad de los virus para adquirir genes de un hospedero y llevarlos a otro organismo (que puede ser o no de la misma especie) representa uno de los mecanismos de resistencia a los antibióticos más notable que existe en el mundo microbiano, pero al mismo tiempo demuestra la fragilidad de las fronteras taxonómicas con las que separamos a los distintos organismos. De hecho, el descubrimiento de que la RNA polimerasa de muchas mitocondrias es homóloga a la del fago T7, que infecta a bacterias, muestra la importancia que los virus tuvieron en la integración genética de los consorcios microbianos que eventualmente dieron origen a las células eucariontes. De manera equivalente, los vestigios de retrovirus que infectaron a nuestros ancestros y cuyo DNA aún podemos identificar en el genoma humano y de otros primates muestra el nivel de intimidad de la convivencia de nuestra especie con virus cuyos parientes actuales subyacen pandemias terribles como la del SIDA.

Aunque no sabemos que tan antiguos sean los virus, es probable que algunos de ellos hayan aparecido en las etapas más antiguas de la evolución celular, pero existen muchos argumentos para rechazar la posibilidad de que provengan de épocas anteriores al surgimiento de los primeros organismos. Desde entonces no han dejado de evolucionar, brincando de especie en especie, modificando sus secuencias y diversificándose al mismo tiempo que los grandes grupos biológicos. Aunque a veces lo olvidamos, salvo unas cuantas excepciones no hemos sido capaces de erradicar a los virus que infectan a los humanos. Sin embargo, sabemos

como prevenir muchas de sus infecciones. Aunque no podamos detener la evolución viral, podemos evitar sus consecuencias. Ello, probablemente, sea uno de los grandes descubrimientos en el estudio de la relación entre nuestra especie y algunos de los patógenos más minúsculos que debemos enfrentar.

Referencias

1. Smith- Hughes, S (1977) *The Virus: a history of the concept* (Science History Publications, New York)
2. Muller, H. J. (1922) *Am. Nat.* **56**: 32-50
3. Green, G. R. (1935) *Science* **82**: 443-445
4. Podolsky, S. (1996) *J. Hist. Biol.* **29**: 79-126
5. Morse, S. S. (1994) *The Evolutionary Biology of Viruses* (Raven Press, New York), pp 1-28
6. Burnet, F. M. (1945) *Virus as organism. Evolutionary and ecological aspects of some human viral diseases* [Dunham Lectures, Harvard University, 1944] (Harvard University Press, Cambridge Mass)
7. La Scola, B., Audio, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J.M., and Raoult, D. (2003) *Science* **299**: 2033
8. Creager, A. N. H. (2002) *The Life of a Virus: tobacco mosaic virus as an experimental model, 1930-1965* (Univeristy of Chicago Press, Chicago)
9. Lazcano, A. (2010) Historical development of origins of life. *In: Perspectives on the Origins of Life* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor) (en prensa)
10. Andrewes, C. H. (1951) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **28**: 211-225
11. Büchen-Osmond, C. (2003) The Universal Virus Database ICTVdB. *Comput. Sci. Eng.* **5**: 16-25
12. Kuhn, JH, Jahrling PB (2010) *Arch. Virol.* **155**: 445-453
13. Baltimore, D. (1971) *Bacteriol. Rev.* **35**: 235-241
14. Koonin, E. V. (2009) *Ann. NY Acad. Sci.* **1178**: 47-64
15. Domingo, E. (2010) *Vet. Res.* **41**: 38-44
16. Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO. (2004) *Science* **304**: 66-74
17. Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S, Wu D, Eisen JA, Hoffman JM, Remington K, Beeson K, Tran B, Smith H, Baden-Tillson H, Stewart C, Thorpe J, Freeman J, Andrews-Pfannkoch C, Venter JE, Li K, Kravitz S, Heidelberg JF, Utterback T, Rogers YH, Falcón LI, Souza V, Bonilla-Rosso G, Eguiarte LE, Karl DM, Sathyendranath S, Platt T, Bermingham E, Gallardo V, Tamayo-Castillo G, Ferrari MR, Strausberg RL, Nealson K, Friedman R, Frazier M, Venter JC (2007) *PLoS Biol.* **5**: e77
18. Culley, A.I., Lang, A. S., and Suttle, C. A. (2007) *Science* **312**: 1795-1798
19. Rybicki, E. (2008) March 27, 2008, *Sci. Am. Online*, www.scientificamerican.com/
20. Knutson, B. A. and Broyles, S. S. (2008) *Virus Genes* **36**: 307-311
21. Lwoff, A. (1957) *J. Gen. Microbiol.* **17**: 239-253
22. Temin, H. M. (1970) *Perspect. Biol. Med.* **14**: 11-26
23. Temin, H. M. (1980) *Cell* **21**: 599-600
24. Becerra, A., Delaye, L., Islas, A., and Lazcano A. (2007) *Annu. Rev. Ecol. Evol. System.* **38**: 361-379
25. Baltimore, D. (1980) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **354**: 492-497
26. Lazcano, A., Guerrero, R., Margulis, L. and Oró, J. (1988) *J. Mol. Evol.* **27**: 283-290
27. Forterre, P. (2006) *Virus Res.* **117**: 5-16
28. Forterre, P and Prangishvili, D. (2009) *Res. Microbiol.* **160**: 466-472
29. Barnes, E. (2005) *Diseases and Human Evolution* (University of New Mexico Press)

Semblanza del Dr. Antonio Lazcano Araujo



Antonio Lazcano Araujo es Profesor en la Facultad de Ciencias de la UNAM, en donde estudio biología y obtuvo el doctorado en ciencias. Allí dirige el Laboratorio de Microbiología, en donde se dedica con su grupo al estudio del origen y la evolución temprana de la vida. Ha sido profesor invitado en diversas universidades europeas y de los EEUU, y es el científico mexicano con mayor número de publicaciones en las revistas *Science* y *Nature*. Es autor de mas de 180 trabajos de investigación y autor de tres libros en español, incluyendo *La Bacteria Prodigiosa*, *La Chispa de la Vida* y *El Origen de la Vida*, del cual se han vendido mas de 650,000 ejemplares. Es Investigador Nacional nivel III, y entre las distinciones recibidas se incluyen la Medalla de Fundador la Universidad de San Francisco de Quito (2007), el Premio Universidad Nacional en Investigación en Ciencias Naturales (UNAM, 2007), el Doctorado Honoris causa de la Universidad de Milan (2008) y la Medalla al Mérito Universitario (Universidad Veracruzana, 2009). Fue dos veces Presidente de la International Society of the Study of the Origins of Life, siendo el primer científico latinoamericano en acceder a este puesto.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 85-92. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

EL PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA RESPUESTA INMUNE

Francisco Javier Sánchez García¹, Fabiola Claudio Piedras¹ y Edgar Abarca Rojano²

¹Laboratorio de Inmunorregulación, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Santo Tomás 11340 México D.F., México

²Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n Col. Santo Tomás, 11340 México D.F., México
fsanchez@encb.ipn.mx

Resumen

Las mitocondrias son organelos celulares que tienen un origen endosimbiótico, y, como menciona Nick Lane [1], sin las mitocondrias las células eucariontes y la complejidad de los organismos multicelulares, simplemente no serían posibles.

Dada su la importancia en la producción de energía metabólica, en forma de ATP, por medio de la fosforilación oxidativa, por mucho tiempo se pensó que esta era la única función de las mitocondrias. Sin embargo, hoy sabemos que las mitocondrias participan en otras importantes funciones celulares entre las que destacan, la muerte celular programada, el proceso de envejecimiento celular, la regulación de la concentración de calcio intracitoplásmico, la sinapsis inmunológica en linfocitos T y en células NK, la inducción de respuestas antivirales, entre otras.

Un aspecto que reviste gran importancia es que la mitocondria tiene su propio genoma (mtDNA) y que, sin embargo, la mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en el genoma nuclear, lo que hace necesaria la comunicación constante entre estos dos genomas. Por lo que una pregunta obligada, en el contexto de la respuesta inmune, es si la expresión de genes nucleares, relacionados con procesos de infección o de activación celular, está controlada por las mitocondrias. Evidencia reciente, incluyendo nuestro propio trabajo, sugiere que así es.

Palabras clave: Mitocondria, núcleo, comunicación, expresión de genes, respuesta inmune.

Abstract

Mitochondria are cellular organelles with an endosymbiotic origin. Nick Lane [1] has mentioned that without mitochondria eukaryotic cells as well as multicellular organisms would have not evolved at all.

Due to their central role in metabolic energy production, in the form of ATP as a consequence of oxidative phosphorylation, it was thought for a long time this was their only function. However, it is known today that mitochondria have a role in many other cell functions such as programmed cell death, cell aging, regulation of intra-cytoplasmic calcium concentration, immune synapse in T lymphocytes and NK cells and antiviral responses, among others.

A relevant issue is that mitochondria have their own genome (mtDNA) but most mitochondrial proteins are encoded in the nuclear genome. Thus, there is a need for a continuous communication between those two genomes. A question, in the context of the immune response, is whether the expression of nuclear genes related to processes such as infection or immune cell activation is subjected to mitochondrial control. Recent evidence, including our own work suggests that this is indeed the case.

Keywords: Mitochondria, nucleus, communication, gene expression, immune response.

Introducción

Con una historia de más de 150 años de estudio, las mitocondrias, al parecer, tienen todavía mucho que mostrarnos sobre su importante función en diversos procesos celulares, incluyendo la respuesta inmune.

Rudolf Albrecht von Kolliker, en 1857, fue el primero en describir a las mitocondrias y en 1890 Richard Altman propuso que se trataba de parásitos intracelulares. Ocho años más tarde, Carl Benda acuñó el término mitocondria, derivado del griego *mitos*, hilo, y *chondrin*, grano, para designar a estos organelos subcelulares [1,2].

En 1912, B.F Kingbury propuso que las mitocondrias podrían ser los centros respiratorios de la célula, basándose en la observación de la pérdida del color de los colorantes empleados para teñir a las mitocondrias. Kingbury propuso que los colorantes eran oxidados por las mitocondrias, en un proceso análogo a la oxidación de los nutrientes durante la respiración celular. Esta hipótesis fue confirmada hasta 1949, cuando Eugene Kennedy y Albert Lehninger demostraron que las enzimas responsables de la respiración celular se localizan, en efecto, en las mitocondrias [1,3].

En 1965, Peter Mitchell postuló la teoría quimiosmótica e introdujo los conceptos de acoplamiento quimiosmótico, gradiente electroquímico y fuerza proton motriz [4,5], lo que sentó las bases para entender cómo las mitocondrias generan energía. Esto, de acuerdo con G. Schatz, constituye una de las aportaciones científicas más importantes de todos los tiempos [2]. Se estima que en una relación peso/peso, las mitocondrias producen entre 10,000 y 50,000 veces más energía por segundo que el sol [2].

A finales de los años 60's, Lynn Margulis planteó nuevamente la posibilidad del origen endosimbiótico de las mitocondrias, después de que esta propuesta había sido ya formulada por Paul Portier en 1918 y por Ivan Williams en 1925. Margulis propuso que las células eucariontes, en un principio organismos anaerobios, se enfrentaron al incremento substancial en la concentración de oxígeno atmosférico como consecuencia de la aparición de organismos fotosintéticos y al aumento en sus requerimientos energéticos, lo cual facilitó el establecimiento de una relación verdaderamente simbiótica entre una bacteria con capacidad para realizar las reacciones de oxido-reducción acopladas a la generación de energía química en forma de enlaces de alto contenido energético o fosforilación oxidativa y, una célula anaerobia heterótrofa. Al paso del tiempo, las funciones de la bacteria endosimbionte se especializaron en la cobertura de los requerimientos energéticos de la célula y, a cambio, la bacteria recibió los nutrientes indispensables para su sobrevivencia, con la consecuente pérdida de su capacidad para sintetizar por si misma la mayor parte de sus proteínas, transformándose en un organelo celular [1,6].

Ya para 1963 Nass y Nass [7,8] habían demostrado la presencia de DNA en las mitocondrias (mtDNA). Sin embargo, hoy sabemos que la mayoría de las proteínas que constituyen a las mitocondrias están codificadas en el DNA nuclear. Las proteínas mitocondriales son sintetizadas en ribosomas, en el citosol, liberadas como precursores completos de cadenas polipeptídicas, e importadas a las mitocondrias. La mayoría de las proteínas mitocondriales poseen secuencias señal en su región N-terminal, por lo que su ingreso a la mitocondria podría iniciar antes de que la síntesis de la cadena polipeptídica haya concluido; este proceso requiere una estricta coordinación entre la mitocondria y el núcleo [9].

La mitocondria está formada por aproximadamente 1500 proteínas diferentes, de las cuales el mtDNA codifica únicamente para los rRNA 12S y 16S, 22 tRNA y 13 polipéptidos. Por su parte, el DNA nuclear codifica para 76 subunidades de la cadena respiratoria y múltiples proteínas implicadas en la transcripción y traducción del mtDNA.

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) es necesario para el transporte de las proteínas al interior de la mitocondria y algunas chaperonas como la hsp70 modulan el estado de agregación y de desdoblamiento de las proteínas mitocondriales y este proceso es dependiente de ATP.

Las proteínas mitocondriales que son sintetizadas en el citoplasma poseen un péptido líder en el extremo N-terminal, el cual sólo es necesario para la internalización de la proteína y es eliminado al final del proceso. Estas pre-secuencias son usadas por las proteínas que tiene como destino a la matriz mitocondrial [9].

Las mitocondrias están constituidas por dos membranas: la membrana externa, que es permeable a iones y solutos menores de 14 KDa, es rica en colesterol y contiene enzimas que comunican a la mitocondria con el resto del metabolismo celular y, la membrana interna que delimita un compartimento que contiene agua, la matriz mitocondrial, en la que se encuentra el mtDNA y varias enzimas solubles como las del ciclo del ácido tricarboxílico. Esta membrana no es libremente permeable a iones y metabolitos, sino que contiene proteínas membranales especializadas en transportar algunos metabolitos a través de la misma. Esta característica es de vital importancia para la integridad morfológica y funcional de las mitocondrias y es también el blanco más común para los compuestos tóxicos para las mitocondrias [10].

Al igual que en las bacterias, la división mitocondrial se lleva a cabo por fisión binaria, por lo que primeramente es necesario un crecimiento mitocondrial antes de la división, proceso que depende del importe de proteínas.

El óxido nítrico (NO) tiene un papel fundamental en la inducción de la biogénesis mitocondrial y el efecto del NO depende de la guanosina 3',5'-monofosfato (cGMP) y es mediado por la inducción del "peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha", un regulador central de la biogénesis mitocondrial [11]. La restricción calórica incrementa la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y del cGMP, lo que a su vez incrementa la biogénesis mitocondrial, el consumo de oxígeno y la producción de ATP [12]. Por otro lado, citocinas pro-inflamatorias, como el TNF- α , reducen la expresión de eNOS, con la reducción concomitante en la biogénesis y en la función mitocondrial [13].

El NO es una molécula de señalización celular involucrada en varias funciones fisiológicas y puede tener efectos deletéreos, dependiendo de su concentración. Algunos de los efectos fisiológicos y patológicos de NO resultan de su acción a nivel mitocondrial [14,15]. El NO se une a la citocromo c oxidasa (complejo IV, COX-IV), en competencia con el oxígeno, inhibiendo su actividad [16,17,18]. La unión de NO al complejo IV, conduce además a un cambio de fosforilación oxidativa a glicólisis, a la redistribución del O₂ y a la regulación de los niveles del factor inducido por hipoxia 1 α (HIF-1 α), lo que contribuye a la adaptación celular a las condiciones de hipoxia a largo plazo [19,20]. Por el contrario, altas concentraciones de NO inhiben a los complejos I y II de la cadena respiratoria, enzimas de la vía glicolítica y del ciclo de Krebs, lo que conduce a la pérdida del balance metabólico y al daño celular [21-25]. Por lo tanto, el NO es un regulador del metabolismo celular que actúa a nivel mitocondrial, reduciendo el consumo de oxígeno y controlando la biogénesis mitocondrial [26].

El NO es generado intracelularmente por las óxido nítrico sintasas (NOS) constitutivas o por la isoforma inducible de NOS (iNOS), expresada por macrófagos activados, en respuesta a citocinas y productos bacterianos [15]. El NO puede actuar en forma autocrina o paracrina, contribuyendo a la actividad anti-microbiana [14,15,27]. En este sentido, se ha demostrado que altas concentraciones de NO inhiben la síntesis de interleucina 12 (IL-12) en macrófagos activados, inhibiendo en forma indirecta la activación de linfocitos Th1, mientras que a bajas concentraciones de NO se incrementa la activación de linfocitos Th1. Al parecer, el NO tiene un efecto directo sobre los linfocitos T CD4⁺ y no sobre las células presentadoras de antígeno. Estos hallazgos muestran que el NO, además de sus efectos anti-microbianos, puede modular la respuesta inmune [28].

El HIF-1 es, como su nombre lo indica, activado por hipoxia. Sin embargo, se ha demostrado que infecciones bacterianas e inflamación también estabilizan al HIF-1 en macrófagos, independientemente de la hipoxia [29]. Una de las consecuencias de la activación de HIF-1 es el incremento en la glicólisis [30,31]. Además, se ha demostrado que HIF-1 disminuye la actividad mitocondrial durante la hipoxia [32,33]. Recientemente se ha demostrado que la activación de macrófagos murinos de la línea J774.A1 con interferón- γ y con LPS produce alteraciones mitocondriales y estabilización de HIF-1 y que en ambos procesos, el NO juega un papel importante. A pesar del cambio metabólico de fosforilación oxidativa a glicólisis, se induce un incremento dramático en la cantidad de ATP, el cual, sin embargo, es insuficiente para cubrir los requerimientos energéticos de los macrófagos activados, lo que lleva a la disminución de la capacidad proliferativa de las células J774 y finalmente a la muerte celular [34].

La producción y el efecto anti-microbiano del NO en respuesta a la infección con micobacterias o a la estimulación con productos micobacterianos está ampliamente documentada [35-37], y se han identificado algunos mecanismos mediante los cuales las micobacterias se protegen del efecto anti-bacteriano del NO [38]. Por otro lado, se ha sugerido que el NO puede contribuir a la generación de un estado de latencia de las micobacterias, lo que explicaría en parte, la capacidad de estas para permanecer en estado de latencia en los portadores asintomáticos [39]. Todo lo anterior, pone de manifiesto la estrecha relación que existe entre el NO, la biogénesis mitocondrial, los efectos bactericidas de los macrófagos y la inducción del estado de latencia en las micobacterias.

En este sentido, desde mediados de 1990 el estudio de la mitocondria y su participación en procesos inmunológicos ha cobrado mayor importancia, desde que se describió la liberación del citocromo c de las mitocondrias al citosol y el papel de éste en la inducción de apoptosis [40].

Con el antecedente de que el adecuado funcionamiento celular depende de la formación y el mantenimiento del retículo mitocondrial, se ha establecido la participación de las mitocondrias en la formación de la sinapsis inmunológica de linfocitos T (en respuesta a la estimulación de CD3 y CD28) y, en la formación de la sinapsis entre células NK y células tumorales de la línea K562 [41,42]. Además, nuestro grupo demostró que la inhibición farmacológica de la ATP sintasa, inhibe la capacidad citotóxica de las células NK [42].

Recientemente se ha demostrado que las mitocondrias participan como “plataformas de señalización” en la respuesta celular a la infección con virus, a través de la vía RIG-1-MAVS (Mitochondrial Anti-Viral Signaling)-IRF-3 [43], señalando la importancia de las mitocondrias en la inmunidad innata [44]. Incluso, se ha comprobado que los componentes de señalización RIG-1/MAVS se translocan a las mitocondrias de macrófagos humanos infectados con el virus de Influenza A [45].

Los receptores de reconocimiento asociados a patrones moleculares (PRRs) son de gran importancia en el desarrollo de inmunidad. La familia de receptores tipo Nod forman parte de los PRRs. Recientemente se describió la presencia de NLRX1 [nucleotide-binding domain (NBD)-and leucine-rich-repeat (LRR) containing family] en la matriz mitocondrial, cuya activación por ligandos específicos genera la producción de especies reactivas del oxígeno, y de esta manera interviene en las vías de señalización NF- κ B y JNK [46].

Además de ser un factor de transcripción nuclear, se ha observado NF- κ B (p50 y p65) en la matriz mitocondrial de células U937 y de células de hígado de rata. Interesantemente, el inhibidor I κ B α también se localiza en la matriz mitocondrial, el cual es fosforilado por alguna de las enzimas de la familia IKK (α , β o γ), de localización mitocondrial y es degradado por una vía independiente de proteosoma.

El factor de transcripción NF- κ B mitocondrial regula negativamente la expresión de genes mitocondriales, específicamente Cox III del complejo IV y Cyt b, del complejo III de la cadena respiratoria, cuando la células son estimuladas con TNF α [47].

El papel de las mitocondrias en la inmunidad anti-bacteriana está menos estudiado. Hasta ahora se ha demostrado que la infección de macrófagos con micobacterias afecta la actividad mitocondrial [48-50] y se ha sugerido que los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) están relacionados con la virulencia de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* [49,50]. Sin embargo, la identidad de las moléculas responsables de la alteración de la función mitocondrial no ha sido identificada.

Algunos factores de patogenicidad bacteriana han mostrado contener secuencias señal, en su porción N-terminal, que permiten su transporte a las mitocondrias [51,52], y varias proteínas bacterianas, incluyendo algunas toxinas de *E.coli* enteropatógena, *Salmonella spp*, *N. gonorrhoea*, *N. meningitides*, *A. baumannii*, *H. pylori*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *C. sordelli*, y *C. difficile* han mostrado tener como blanco celular a las mitocondrias [revisado en 53]. De estas proteínas, la proteína asociada a mitocondria (Map, antes Orf19) y la proteína EspF de *E.coli* enteropatógena, ingresan a la célula a través del sistema secretor tipo 3 y se localizan en las mitocondrias de las células blanco [51,52]. Interesantemente, Map causa disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) pero, aparentemente, no es responsable de la inducción de apoptosis dependiente de la infección con *E.coli* enteropatógena [51,53,54].

Un mecanismo antibacteriano recientemente descrito en los eosinófilos involucra directamente a las mitocondrias y al DNA mitocondrial. Yousefi y cols. [55] demostraron que cuando los eosinófilos, previamente estimulados con LPS, son estimulados con IL-5 o con IFN- γ liberan su DNA mitocondrial en forma de "catapulta", en menos de un segundo y que, en el espacio extracelular el mtDNA y las proteínas de los gránulos, también liberadas, forman estructuras capaces de destruir a las bacterias.

Por otro lado, dos componentes mitocondriales (mtDNA y péptidos formilados), han sido considerados como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), se les ha dado el nombre de DAMPs mitocondriales (MTDs), y han sido asociados con el desarrollo del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), a consecuencia del daño a tejidos (ej. golpes y quemaduras) [56].

Un dato adicional de la importancia de las mitocondrias en la inmunidad adaptativa e innata es su participación en la sinapsis inmunológica en linfocitos T [41] y en células NK [42].

Las mitocondrias tienen un ancestro bacteriano (una α -proteobacteria) y, durante la evolución de esta bacteria a endosimbionte y posteriormente a organelo, transfirió una parte importante de su genoma al núcleo celular. Por lo tanto, la biogénesis mitocondrial requiere de la comunicación constante entre el genoma nuclear y el genoma mitocondrial. Es posible que esta comunicación entre genomas vaya más allá de la biogénesis mitocondrial y que otras importantes funciones celulares dependan también de esta comunicación, por lo que empleando un modelo de células J774 (línea de macrófagos de ratón) carentes de DNA mitocondrial (mtDNA), por exposición prolongada a bajas concentraciones de bromuro de etidio, evaluamos recientemente si la expresión de genes de citocinas (codificados en el genoma nuclear), en respuesta a la estimulación con LPS o a la infección con *Mycobacterium bovis* BCG, se ve afectada por la carencia de mtDNA. Nuestros resultados sugieren que la expresión de algunos genes que codifican para citocinas está regulada por las mitocondrias, lo que implica, tomando en cuenta todo lo anterior, que las mitocondrias tienen un papel muy importante en la respuesta inmune.

Referencias

1. Lane, N. (2005) *Power, sex, suicide. mitochondria and the meaning of life*. Oxford University press, Oxford, UK.
2. Schatz, G. (2007) *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 673-78.
3. Kenedy, E.P., Lehninger, A.L. (1949) *J. Biol. Chem.* **179**, 957-72.
4. Mitchell, P., Moyle, J. (1965) *Nature* **208**, 147-51.
5. Mitchell, P., Moyle, J. (1965) *Nature* **208**, 1205-6.
6. Margulis, L. (1970). *Origin of eukaryotic cells*. Yale University Press, Yale, USA.
7. Nass, M.M., Nass, S. (1963a) *J. Cell Biol.* **19**, 593-611.
8. Nass, M.M., Nass, S. (1963b) *J. Cell Biol.* **19**, 613-29.
9. Neupert, W., Herrmann, J.M. (2007) *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 723-49.
- Kenny, B., Jepson, M. (2000). *Cell Microbiol.* **2**, 579-590.
- Nemoto, Y., De Camilli, P. (1999). *EMBO J.* **18**, 2991-3006.
10. Wallace, K.B., Starkov, A.A. (2000). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 353-88.
11. Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S., Carruba, M.O. (2003) *Science* **299**, 896-9.
12. Nisoli, E., Falcone, S., Tonello, C., Cozzi, V., Palomba, L., Fiorani, M., Pisconti, A., Brunelli, S., Cardile, A., Francolini, M., Cantoni, O., Carruba, M.O., Moncada, S., Clementi, E. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 16507-12.
13. Valerio, A., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Pisconti, A., Palomba, L., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., Carruba, M.O., Nisoli, E. (2006) *J. Clin. Invest.* **116**, 2791-2798.

14. Gross, S.S., Wolin, M.S. (1995) *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 737-769.
15. Moncada, S., Higgs, E.A. (1995). *FASEB J.* **9**, 1319–1330.
16. Brown, G.C., Cooper, C.E. (1994) *FEBS Lett.* **356**, 295–298.
17. Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley-Usmar, V.M., Moncada, S., Schapira, A.H. (1994) *FEBS Lett.* **345**, 50–54.
18. Schweizer, M., Richter, C. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 169–175.
19. Hagen, T., Taylor, C.T., Lam, F., Moncada, S. (2003) *Science* **302**, 1975–1978.
20. Almeida, A., Moncada, S., Bolaños, J.P. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 45–51.
21. Stuehr, D.J., Nathan, C.F. (1989) *J. Exp. Med.* **169**, 1543–1555.
22. Stadler, J., Billiar, T.R., Curran, R.D., Stuehr, D.J., Ochoa, J.B., Simmons, R.L. (1991) *Am. J. Physiol.* **260**, C910–C916.
23. Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M., Moncada, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7631–7636.
24. Beltrán, B., Mathur, A., Duchon, M.R., Erusalimsky, J.D., Moncada, S. (2000a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 14602-14607.
25. Beltrán, B., Orsi, A., Clementi, E., Moncada, S. (2000b) *Br. J. Pharmacol.* **129**, 953–960.
26. Nisoli, E., Tonello, C., Cardile A., Cozzi V., Bracale R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. (2005) *Science* **310**, 314-347.
27. Liew, F.Y. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 396–399.
28. Niedbala, W., Wei, X.Q., Piedrafita, D., Xu, D., Liew, F.Y. (1999) *Eur. J. Immunol.* **29**, 2498-2505.
29. Peyssonnaud, C., Datta, V., Cramer, T., Doedens, A., Theodorakis, E.A., Gallo, R.L., Hurtado-Ziola, N., Nizet, V., Johnson, R.S. (2005) *J. Clin. Invest.* **115**, 806-1815.
30. Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., Wang, G.L. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 23757-23763.
31. Ebert, B.L., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29083-29089.
32. Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., Denko, N.C. (2006) *Cell Metab.* **3**, 187-197.
33. Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., Dang, C.V. (2006) *Cell Metab.* **3**, 177-185.
34. Garedew, A., Moncada, S. (2008) *J. Cell Sci.* **121**, 3468-3475.
35. Stuehr, D.J., Marlettz, M.A. (1987) *J. Immunol.* **139**, 518-525.
36. Bose, M., Farnia, P., Sharma, S., Chattopadhyaya, D., Saha K. (1999) *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **12**, 69-79.
37. Pacheco-García, U., Legorreta-Herrera, M., Hernández-Rodríguez, C., Sánchez-García, F.J. (2002) *Scand. J. Immunol.* **56**, 52-58.
38. Davis, A.S., Vergne, I., Master, S.S., Kyei, G.B., Chua, J., Deretic, V. (2007) *PLoS Pathog.* **3**, e186.
39. Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., Schoolnik, G.K. (2003) *J. Exp. Med.* **198**, 705-713.
40. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. (1997) *Science* **275**, 1132-1136.
41. Quintana, A., Schwindling, C., Wenning, A.S., Becherer, U., Rettig, J., Schwarz, E.C., Hoth, M. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 4418-4423.
42. Abarca-Rojano, E., Muñoz-Hernández, S., Moreno-Altamirano, M.M.B., Mondragón-Flores, R., Enriquez-Rincón, F., Sánchez-García, F.J. (2009) *Immunol. Lett.* **122**, 18-25.
43. Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Chen, Z.J. (2005) *Cell* **122**, 669-82.
44. McWhirter, S.M., Tenover, B.R., Maniatis, T. (2005) *Cell* **122**, 645-647.
45. Ohman, T., Rintahaka, J., Kalkkinen, N., Matikainen, S., Nyman, T.A. (2009) *J. Immunol.* **182**, 5682-5692.
46. Arnoult, D., Soares, F., Tattoli, I., Castanier, C., Philpott, D.J., Girardin, S.E. (2009) *J. Cell Sci.* **122**, 3161-3168.
47. Cogswell, P.C., Kashatus, D.F., Keifer, J.A., Guttridge, D.C., Reuther, J.Y., Bristow, C., Roy, S., Nicholson, D.W., Baldwin, A.S. Jr. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2963-2968.
48. Duan, L., Gan, H., Golan, D.E., Remold, H.G. (2002) *J. Immunol.* **169**, 5181-5187.

49. Abarca-Rojano, E., Rosas-Medina, P., Zamudio-Cortéz, P., Mondragón-Flores, R., Sánchez-García, F.J. (2003) *Scand. J. Immunol.* 58, 419-427.
50. Chen, M., Gan, H., Remold, H.G. (2006) *J. Immunol.* 176, 3707-3716
51. Keane, J., Remold, H.G., Kornfeld, H. (2000) *J. Immunol.* 164, 2016-2020.
52. Nougayrède, J.P., Donnenberg, M.S. (2004) *Cell Microbiol.* 6, 1097-1111.
53. Kozjak-Pavlovic, V., Ross, K., Rudel, T. (2008) *Curr. Op. Microbiol.* 11, 9-14.
54. Papatheodorou, P., Domanska, G., Oxle, M., Mathieu, J., Selchow, O., Kenny, B., Rassow, J. (2006) *Cell Microbiol.* 8, 677-689.
55. Yousefi, S., Gold, J.A., Andina, N., Lee, J.J., Kelly, A.M., Kozłowski, E., Schmid, I., Straumann, A., Reichenbach, J., Gleich, G.J., Simon, H.U. (2008) *Nat. Med.* 14, 949-953.56.- Zhang, Q., Raof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., Hauser, C.J. (2010) *Nature* 464, 104-108.
56. Zhang, Q., Raof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., Hauser C.J. (2010) *Nature* 464, 104-108.

Semblanza del Dr. Francisco Javier Sánchez García



Cursó la carrera de Químico Bacteriólogo y Parasitólogo en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politecnico Nacional (1978-1983), así como la maestría y el doctorado en Ciencias en Inmunología, en la misma institución académica (1983-1989), siendo su director de tesis doctoral el Dr. Luis Antonio Jiménez Zamudio.

Realizó estancias de investigación en "University College London" en Londres, Inglaterra, en el "National Institute for Medical Research", también en Londres y, en "University of Florida", en los Estados Unidos, trabajando con los profesores Nicholas Avrion Mitchison, Joseph M. Colston y Wayne T. McCormack, respectivamente. A su regreso de siete años en el extranjero, se incorporó como profesor-investigador al programa de postgrado en inmunología de la ENCB-IPN.

Ha publicado su trabajo científico en revistas como *European Journal of Immunology*, *Immunology*, *Scandinavian Journal of Immunology*, *Immunology Letters*, entre otras. Ha recibido algunas distinciones académicas entre las que destaca el primer lugar del Premio Nacional de Investigación Glaxo Smith Kline. Algunos de los temas científicos que actualmente capturan su atención incluyen: la actividad mitocondrial en diversos procesos inmunológicos como la citotoxicidad celular, la presentación de antígenos y la producción de citocinas en respuesta a la infección; los mecanismos celulares que regulan la respuesta proliferativa de linfocitos T; la comunicación, a nivel de la membrana citoplásmica, entre los patógenos y su célula hospedera.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 93-99. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

FUNCIONES TIROIDEAS Y EXTRA-TIROIDEAS DEL YODO

Brenda Anguiano

Instituto de Neurobiología, UNAM. Boulevard Juriquilla 3001. Querétaro 76230
anguianoo@unam.mx

Resumen

El yoduro (I^-) es un micronutriente esencial en la fisiología de los seres vivos, siendo la glándula tiroides el tejido que presenta la mayor captación de yodo en todos los vertebrados. El I^- es internalizado a través de un contransportador membranar Na^+/I^- , denominado simportador sodio/yodo (NIS). Dentro de los tirocitos el I^- es oxidado por la tiroperoxidasa y es transformado a especies más reactivas, como el yodo molecular (I_2). El yodo participa en la síntesis de hormonas tiroideas y mantiene la integridad epitelial de los folículos tiroideos. Sin embargo, diversos estudios muestran que, además de los bien conocidos efectos del yodo en la fisiología tiroidea, éste también es captado por tejidos extratiroideos, como las glándulas salivales, la mucosa gástrica y el intestino. Se ha propuesto que en estos tejidos, su captura está relacionada con la conservación y reciclamiento del yodo. Estudios recientes muestran que los epitelios mamarios y prostáticos cancerosos, también captan yodo, lo cual está relacionado con importantes efectos antiproliferativos y apoptóticos. Actualmente se analizan los posibles mecanismos del yodo involucrados en estos procesos.

Palabras clave: Yodo, antioxidante, proliferación, apoptosis, cáncer.

Abstract

Iodine (I^-) is an essential micro nutriment for life. Thyroid gland, exhibits the highest I^- levels of uptake in all vertebrates. It is internalized through a membranal symporter Na^+/I^- (NIS). In thyrocytes, it is well established that I^- is oxidized by tyroperoxidase and is transformed into more reactive species, such as molecular iodine (I_2). The iodine supply is crucial in the synthesis of thyroid hormones and to maintain the epithelial integrity of thyroid follicles. Several studies support the notion that iodine also is uptake and metabolized by extra thyroidal tissues, such as mammary gland, salivary glands, and intestinal mucosa. It has been proposed that in these tissues, its capture is related to recycling and conservation of iodine. Recent studies show that breast, prostate, and neuroblastoma cancer cells, also capture iodine, which is associated with significant antiproliferative and apoptotic effects. Currently, studies analyzing the possible mechanisms involved in these processes as well as their possible therapeutic use in pathologies as hyperplasia and cancer are in course.

Keywords: Iodine, antioxidant, proliferation, apoptosis, cancer.

Naturaleza química del yodo

El yodo es un elemento químico del grupo de los halógenos, que se clasifica en el grupo 7A de la tabla periódica. Posee un número atómico de 53, un peso atómico de 126.9 y una solubilidad de 0.3 g/L. El yodo cuenta con 7 electrones en su último orbital, de los cuales uno generalmente está desapareado. Esta característica lo hace altamente reactivo para combinarse con otro elemento, y completar así una configuración estable de ocho electrones. La alta electronegatividad del yodo, le confiere una gran capacidad de atraer electrones. Dependiendo de su estado de óxido-reducción (-1, +1, 0, +3, +5, +7), el yodo puede presentar diversas formas químicas. Las especies de yodo que existen a pH 7.4 son el yoduro (I^-), yodo molecular (I_2), ácido hipoyodoso (HOI) y el ión hipoyodito (OI^-). A continuación se revisa como en condiciones fisiológicas, algunas especies de yodo (I_2 y HOI), pueden actuar tanto en la tiroides como en sitios extra-tiroideos: 1) de manera directa neutralizando especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o 2) de manera indirecta, formando compuestos yodados (hormonas, lípidos) con distinta actividad biológica [1,2].

Distribución, capacidad antioxidante y ciclo del yodo

Se considera que el yodo es un elemento traza, porque en muchas regiones del mundo, primordialmente en las zonas montañosas, la erosión del suelo ha provocado un agotamiento de este elemento en la superficie terrestre. No obstante los océanos y las zonas costeras representan los sitios con mayor cantidad de yodo, su concentración continúa siendo muy baja, alcanzando niveles menores a 1 mM. Las algas marinas cafés, del género *Laminaria*, representan los reservorios biológicos más efectivos de yodo concentrado, encontrándose niveles superiores a 50 mM. Efectivamente, las algas marinas son los seres vivos con mayor concentración de yodo en su matriz extracelular, y esto correlaciona con el hecho de que fueron los primeros seres vivos en producir oxígeno, el cual era tóxico en la atmósfera primitiva. Aparentemente la función antioxidante del yodo surge en los primeros organismos fotosintéticos (cianobacterias), como parte de una respuesta adaptativa para neutralizar las especies reactivas

de oxígeno (ROS). Existen evidencias de que, en presencia de una haloperoxidasa, el I^- puede actuar como un antioxidante (donador de electrones) y liberar compuestos yodados a la atmósfera. En efecto, como producto de su metabolismo, las algas producen y emiten a la atmósfera una mezcla de halocarbonos volátiles y especies reactivas de yodo (I_2), contribuyendo así, al importante ciclo del yodo. Existen evidencias de que la capacidad antioxidante del yodo persiste no sólo en las algas modernas, sino también en el resto de los organismos capaces de captar yodo [3-5].

Perspectiva evolutiva

– Los mecanismos no están bien comprendidos, pero existen evidencias de que, además de las algas, la captura de yodo está presente en una gran diversidad de seres vivos (bacterias, plantas, esponjas, cnidarios, artrópodos y vertebrados).

– Estudios en diversos tipos de plantas (trigo, nabo, arroz) han mostrado la captura de distintas formas químicas de yodo (I^- , I_2 , yodato, IO_3^-). Se desconoce la relevancia fisiológica de este hallazgo, pero se ha encontrado una relación directa entre captura y crecimiento [6,7].

– En invertebrados marinos se ha encontrado que los polipos de *Aurelia aurita*, captan I^- y que este elemento es crucial para el proceso de estrobilación, por medio del cual los polipos (sésiles) se metamorfosean en medusas (vida libre). Existen evidencias de que el I^- puede ser oxidado por radicales libres a I_2 , organificado a residuos de tirosina y formar compuestos yodados (mono y diyodotirosinas) [8,9]. Aunque estos compuestos también se han encontrado en anélidos, artrópodos y moluscos, se desconoce su función.

– Los protocordados como las ascidias y los anfioxos, han desarrollado una glándula subfaringea especializada en captar yodo, denominada endostilo. En algunos vertebrados primitivos como la lamprea, esta glándula está presente sólo en la etapa larval, pues durante la metamorfosis, el endostilo se diferencia en tejido tiroideo. Se ha propuesto que la aparición de estas estructuras (captadoras de yodo), están asociadas al cambio que sufrieron los primeros vertebrados, al transitar del medio marino a uno deficiente en yodo (estuarios, ríos y ambiente terrestre) [10].

– En los vertebrados, surge la glándula tiroidea, como el principal órgano concentrador de yodo; sitio en el cual se lleva a cabo la síntesis de hormonas tiroideas (HT): tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3). Estas hormonas tienen efectos en prácticamente todos los órganos, clasificándose sus efectos en dos grandes grupos: diferenciadores y metabólicos [11]. En los anuros se ha demostrado que la administración de yoduro, acelera la metamorfosis de los renacuajos. Dicho efecto parece ser directo y no estar mediado por HT, pues incluso en las larvas tiroidectomizadas, el I^- induce la metamorfosis [12]. Aunado a lo anterior, estudios en mamíferos (roedores y humanos), han mostrado la existencia de sitios extra-tiroideos, capaces no sólo de captar yodo, sino también de organificarlo y generar moléculas yodadas con actividad biológica. A continuación se revisa la participación del yodo, en la fisiología tiroidea y extra-tiroidea.

Captura de yodo/ organificación / fisiología tiroidea

El yodo es un elemento traza, que los organismos lo adquieren de la dieta, primordialmente en forma de yoduro. Los requerimientos diarios para mantener el funcionamiento tiroideo oscilan entre 100 y 200 μg . Como se mencionó anteriormente, el yodo es esencial para la síntesis de HT. Un inadecuado aporte de yodo, se acompaña de hipotiroidismo lo cual se puede reflejar en bocio, alteraciones en el desarrollo, retraso mental (cretinismo), etc. Actualmente, la yodación de la sal, con yoduros o yodatos, es una estrategia efectiva en prevenir

la deficiencia de yodo, debido a que la sal es extensamente utilizada en el procesamiento de los alimentos [13]. Además de un aporte adecuado, la biodisponibilidad de yodo en la tiroides, depende de la actividad del transportador de yoduro. El simportador Na^+/I^- (NIS) es una glucoproteína de 13 dominios transmembranales, que se localiza en la membrana basal del tirocito y pertenece a la familia de cotransportadores de Na^+ /solutos. EL NIS internaliza un ión I^- contra el gradiente electroquímico, utilizando el gradiente de concentración del Na^+ , generado por la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ [14]. A partir de este mecanismo, el I^- es concentrado en la tiroides, alcanzando concentraciones 40 veces más grandes que las encontradas en el fluido extracelular o plasma [15]. En la membrana apical del tirocito, el I^- es translocado al lumen folicular a través de otros transportadores como pendrina (intercambiador I^-/Cl^-) y el transportador apical (AIT) [16,17]. En la región apical, el I^- es organificado por medio de la tiroperoxidasa (TPO), a los residuos tirosina de la tiroglobulina (Tg), para dar lugar a la formación de monoyodotirosinas (MIT) y diyodotirosinas (DIT). El acoplamiento de estos residuos dentro de la Tg, resulta en la formación de yodotironinas u HT. El paso limitante en la síntesis de estas hormonas, es la disponibilidad de I^- , Tg y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 actúa como sustrato de la TPO y es generado por la oxidasa tiroidea (Duox), la cual requiere calcio y NADPH como cofactor [18]. La hormona estimulante de tiroides (TSH) estimula el transporte de I^- , así como su organificación para la síntesis de hormonas tiroideas. La deficiencia de yodo se acompaña de hipotiroidismo, bocio y en defectos en el desarrollo, mientras que un exceso provoca alteraciones tiroideas que pueden cursar de un hipertiroidismo a un hipotiroidismo. El exceso de yodo disminuye la respuesta tiroidea a TSH, lo cual se refleja en una menor disponibilidad de hormonas tiroideas, a través de inhibir su liberación, captura y organificación (efecto Wolff-Chaikoff) [19,20]. La exposición a niveles elevados de yodo también está asociado a una disminución de la vascularidad de la glándula [21]. Por esta razón, los pacientes con enfermedad de Graves (hipertiroidismo) son tratados con una mezcla de yodo molecular y yoduro de potasio (Lugol), para reducir la vascularización y tamaño glandular, antes de la cirugía [22,23]. En cuanto a posibles mecanismos moleculares, estudios en folículos tiroideos humanos y de rata, han mostrado que un exceso de I^- inhibe la expresión de NIS y de VEGF (factor de crecimiento endotelial vasoactivo) de una manera dosis-dependiente [24,25]. Aunado a lo anterior, se ha encontrado que la reducción del tamaño tiroideo, podría estar mediado a través de la formación de lípidos yodados (yodolactonas) con actividad apoptótica [26].

Captura de yodo en sitios extratiroides

Se ha reportado la expresión de NIS en varios tejidos; sin embargo, no en todos se ha demostrado su capacidad de captar y organificar yoduro (I^-). En la glándula mamaria lactante, en las glándulas salivales y en la mucosa gástrica, está bien documentada la captura de I^- por medio de este transportador. De manera similar a la tiroides, el NIS se localiza en la membrana basal de estos epitelios. En la glándula mamaria lactante, el NIS participa en la translocación de I^- de la sangre a la leche, pues su aporte es indispensable para la síntesis de hormonas tiroideas por parte del neonato. Se ha mostrado que en las glándulas salivales y el estómago el NIS transloca al I^- del torrente sanguíneo hacia la saliva o lumen gástrico, y se ha propuesto que en estos compartimentos el I^- podría ejercer un efecto bactericida. Existen evidencias de que NIS también se expresa en el intestino, pero a diferencia de los epitelios anteriores, éste se localiza en la membrana apical del enterocito y parece estar involucrado en la conservación y reciclamiento del yodo [27-30]. En efecto, se conoce que el 23% de la poza total de yodo se localiza en el circuito gastro-intestinal [31]. Está bien establecido que la regulación de NIS ocurre de manera órgano-específica, pues si bien en la tiroides su expresión es inducida por TSH e inhibida por concentraciones elevadas de I^- , en la glándula mamaria su expresión depende de oxitocina y prolactina.

La expresión de NIS, también ha sido observada en otros tejidos como cerebro, piel, testículos, timo, epidermis, plexos coroides, pero hasta el momento no existen estudios que sostengan un papel funcional [14,32].

Efectos antitumorales del yodo

La capacidad que tienen algunos tejidos extra-tiroideos de captar yodo, ha llamado la atención en la clínica, dado que la administración de yodo radiactivo (^{131}I) es una de las terapias más ampliamente utilizadas para tratar los tumores tiroideos. Desafortunadamente, estos tratamientos no discriminan entre células cancerosas y no-cancerosas, acompañándose por lo tanto de efectos secundarios. Sin embargo, estudios recientes han mostrado importantes efectos antineoplásicos del yodo (no-radiactivo) en diferentes tejidos y líneas celulares captadoras de yodo. Estudios en ratas han mostrado que la suplementación con dosis moderadamente elevadas de I_2 (pero no I^- , ni HT), reduce la incidencia de tumores mamarios (inducidos por carcinógenos químicos), disminuyendo la proliferación celular e induciendo la apoptosis. Estos hallazgos han sido corroborados en líneas celulares de cáncer mamario humano y están mediados por un incremento en las proteínas p53, p21, el índice Bax/Bcl-2 y la activación de caspasas efectoras. [33,34]. En ambos modelos (*in vivo* e *in vitro*), se ha encontrado una relación directa entre el tratamiento con I_2 y la formación de un lípido yodado denominado 6-yodolactona (6-IL), a partir de la yodación del ácido araquidónico [35,36]. Se desconoce el mecanismo de acción del yodo, pero existen evidencias de que la 6-IL podría actuar como un ligando de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) [37]. Aunado a lo anterior, estudios recientes sugieren que el tratamiento con yodo a células de cáncer mamario humano, disminuye la expresión de algunos genes dependientes de estrógenos [38].

La próstata es otro tejido dependiente de hormonas sexuales, en donde se ha demostrado la captura de yodo. En un modelo experimental de hiperplasia prostática (inducido por hormonas sexuales), se encontró que la suplementación de ambas formas químicas de yodo (I^- o I_2), evitan el crecimiento de la glándula [39]. Es probable que a diferencia de la glándula mamaria, la respuesta al I^- se deba a que el epitelio prostático tenga la capacidad de transformarlo a I_2 o a otra especie reactiva de yodo. Por otra parte, estudios recientes muestran que los efectos apoptóticos del I_2 y de la 6-yodolactona, se extienden a otros tipos de cáncer, como en neuroblastoma [40]. En contraste, aunque las células de cáncer de colon expresan NIS y captan I^- , el tratamiento con estos compuestos no tiene ningún efecto antitumoral en este tipo de cáncer [40,41].

Comentarios

En conjunto, todos estos hallazgos indican que los efectos del yodo van más allá de la fisiología tiroidea. Sustentan la noción de la importancia de la capacidad del I^- para transformarse (vía enzimática o no enzimática) en una especie más reactiva (I_2), actuando como antioxidante y/o organificándose y dar lugar a la formación de compuestos yodados, como las HT o yodolactonas. La mayor sensibilidad de las células cancerosas a los efectos antitumorales, sugiere un potencial uso terapéutico del yodo en patologías como hiperplasia y cáncer

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente apoyado por CONACYT (78955, 87196) y DGAPA-UNAM (IN2012010).

Referencias

1. Cooper, R.A. (2007). *Int. Wound. J.* **4**:124-137
2. Kessler, J., Hooge, D. (2007). *Thyroid* **17**: 19-24
3. Venturi, S. (2000). *Thyroid* **10**: 727-729
4. Carpenter, L.J. (2003). *Chem. Rev.* **103**: 4953-4962
5. Küpper, F.C., Carpenter, L.J., McFiggans, G.B., Palmer, C.J., Waite, T.J., Boneberg, E.M., Woitsch, S., Weiller, M., Abela, R., Grolimund, D., Potin, P., Butler, A., Luther, G.W., Kroneck, P.M., Meyer-Klaucke, W., Feiters, M.C. (2008). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 6954-6958
6. Burte, P.P., Nair, A.G.C., Manohar, S.B., Prakash, S. (1991). *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.* **155**: 391-402
7. Muramatsu, Y., Christoffers, D., Ohmomo, Y. (1983). *J. Rad. Res.* **24**: 326-338
8. Silverstone, M., Galton, V.A., Ingbar, S.H. (1978). *Gen. Comp. Endocrinol.* **34**: 132-140
9. Berking, S., Czech, N., Gerharz, M., Herrmann, K., Hoffman, U., Raifer, H., Sekul, G., Siefker, B., Sommerei, A., Vedder, F. (2005). *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 969-976
10. Eales, J.G. (1997). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **214**: 302-317
11. Hulbert, A.J. (2000). *Biol. Rev.* **75**: 519-631
12. Swingle, W.W. (1919). *J. Gen. Physiol.* **1**: 593-606
13. Zimmermann, M.B. (2009). *Gastroenterology* **137**: S36-S46
14. Dohán, O., De la Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, C.S., Carrasco, N. (2003). *Endocr. Rev.* **24**: 48-77
15. Cavalieri, R.R. (1997) *Thyroid* **2**:177-181
16. Rodriguez, A.M., Perron, B., Lacroix, L., Caillou, B., Leblanc, G., Schlumberger, M., Bidart, J.M., Pourcher, T. (2002). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**:3500-3503
17. Bizhanova, A., Kopp, P. (2009). *Endocrinology* **150**:1084-1090
18. Ruf, J., Carayon, P. (2006). *Arch. Biochem. Biophys.* **445** 269-277
19. Emerson, C.H., Anderson, A.J., Howard, W.J., Utiger, R.D. (1975). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **40**: 33-36
20. Wolf, J., Chaikoff, L. (1948). *J. Biol. Chem.* **174**: 555-564
21. Erbil, Y., Ozluk, Y., Giriş, M., Salmaslioglu, A., Issever, H., Barbaros, U., Kapran, Y., Ozarmağan, S., Tezelman, S (2007). *J. Clin. Endocr. Metab.* **92**: 2182-2189
22. Chang, D.C., Wheeler, M.H., Woodcock, J.P., Curley, I., Lazarus, J.R., Fung, H., John, R., Hall, R., McGregor, A.M. (1987). *Surgery* **102**: 1055-1061
23. Arntzenius, A.B., Smith, L.J., Schipper, J., van der Heide, D., Meinders, A.E. (1991). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**: 1051-1055
24. Yamada, E., Yamazaki, K., Takano, K., Obara, T., Sato, K. (2006). *Thyroid* **16**: 545-554
25. Suzuki, K., Kimura, H., Wu, H., Kudo, N., Bae, K., W., Suzuki, S., Yoshida, A., Caturegli, P., Kohn, L.D. (2010). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**: 286-290
26. Langer, R., Burzler, C., Bechtner, G., Gartner, R. (2004). *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **111**: 325-329
27. Josefsson, M., Evilevitch, W.B., Grunditz, T., Ekblad, E. (2006). *Exp. Bio. Med.* **231**: 227-281
28. Tazebay, U.H., Wapnir, I.L., Levy, O., Doha'n, O., Zuckier, L.S., Zhao, Q.H., Deng, H.F., Amenta, P.S., Fineberg, S., Pestell, R.G., Carrasco, N. (2000). *Nat. Med.* **6**:871-878
29. De, S.K., Ganguly, C.K., Chakraborty, T.K., Bose, A.K., Banerjee, R.K. (1985). *Acta Endocrinol.* **110**: 383-387
30. Nicola, J.P., Basquin, C., Portulano, C., Reyna-Neyra, A., Paroder, M., Carrasco, N. (2009). *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**: 654-662
31. Hays, M.T., Solomon, D.H. (1965). *J. Clin. Invest.* **44**:117-127
32. Perron, B., Rodriguez, A.M., Leblanc, G., Pourcher, T. (2001). *J. Endocrinol.* **170**: 185-196
33. García-Solís, P., Alfaro, Y., Anguiano, B., Delgado, G., Guzman, R., Nandi, S., Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Aceves, C. (2005). *Mol. Cell Endocrinol.* **236**: 49-57
34. Arroyo-Helguera, O., Anguiano, B., Delgado, G., Aceves, C. (2006). *Endocr. Relat. Cancer* **13**: 1-13

35. Arroyo-Helguera, O., Rojas, E., Delgado, G., Aceves, C. (2008). *Endocr. Relat. Cancer* 15:1003-1011
36. Aceves, C., García-Solís, P., Arroyo-Helguera, O., Vega-Riveroll, L., Delgado, G., Anguiano, B. (2009). *Mol. Cancer* 8: 33
37. Nuñez-Anita, R.E., Arroyo-Helguera, O., Cajero-Juárez, M., López-Bojorquez, L., Aceves, C (2009). *Prost. Other Lipid Mediat.* 89 34–42
38. Stodard, F.R., Brooks, A.D., Eskin, B.A., Johannes, G.J. (2008). *Int. J. Med. Sci.* 5: 189-196
39. Aceves, C., Anguiano, B. (2009). Is iodine an antioxidant and antiproliferative agent for the mammary and prostate glands. *Comprehensive Handbook of Iodine*. In: Victor R Preedy, Gerard N Burrow and Ronald Watson, Eds, Oxford: Academic press, USA
40. Rösner, H., Torremante, P., Möller, W., Gärtner, R (2009). *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 117: 1–10
41. Gaertner, F.C., Rohde, F., Mueller, J., Blechert, B., Janssen, K.P., Essler, M. (2009). *Int. J. Cancer* 125: 2783–2791

Semblanza de la Dra. Brenda Anguiano



Estudié la Licenciatura en Biología en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales “Iztacala” (UNAM, 1990), así como la Maestría (1994) y Doctorado (2000) en Ciencias Fisiológicas (IIB-UNAM). Durante mi formación académica realice estancias de investigación en la Universidad de McGill (Montreal, Canadá) y en la Universidad de Berkeley (San Francisco, CA, USA). De 1998-1999 estuve adscrita como profesor al departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-Iztapalapa) y en el 2000 me incorpore al departamento de Fisiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN). En el 2001 me integré al grupo de la Dra. Carmen Aceves (CNB-UNAM), como Investigador Asociado de tiempo completo y me integré a sus proyectos de investigación encaminados a analizar la participación de los compuestos yodados en la fisiología y patología de la glándula mamaria. En el 2004 nuestro grupo de investigación obtuvo el segundo lugar al premio “Alejandrina a la Investigación y a la Creación Artística, por las aportaciones de los efectos antiproliferativos y apoptóticos del yodo en el cáncer mamario. Actualmente soy Investigadora Titular “A” del Instituto de Neurobiología-UNAM. Cuento con 19 publicaciones internacionales indexadas. He graduado estudiantes de Licenciatura y Maestría, y actualmente dirijo tesis de Licenciatura, Maestría y Doctorado. Soy Investigador Nacional Nivel 1. He participado en numerosos congresos nacionales e internacionales. Participo activamente en la formación de recursos humanos a distintos niveles (docencia, servicio social, veranos científicos, etc.), así como en actividades de difusión y divulgación científica (ferias científicas, entrevistas de radio y TV, organización de eventos como la semana del cerebro, etc.). Mi tema de investigación actual se enfoca al estudio de la participación de las tironinas y el yodo, en el desarrollo normal y neoplásico de la próstata.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 101-120. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

RUTAS METABÓLICAS DE OXIDACIÓN DEL AZUFRE EN BACTERIAS QUIMIOLITOAUTÓTROFAS, RELEVANCIA AMBIENTAL Y BIOTECNOLOGÍA

Jesús Espinosa Márquez, Sergio Revah y Sylvie Le Borgne
Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-Cuajimalpa
Artificios 40, Col. Hidalgo, Delegación Álvaro Obregón, 01120 México D. F.
sylvielb@correo.cua.uam.mx

Resumen

La oxidación de compuestos reducidos de azufre inorgánicos a azufre elemental y sulfato por bacterias quimiolitotróficas tiene importancia aplicada para la eliminación de sulfuro en efluentes, en la corrosión microbiana del concreto y en biominería. Los compuestos inorgánicos de azufre son exclusivamente oxidados por bacterias y arqueas. Las bacterias sulfoxidantes, se agrupan principalmente en la clase de las Gammaproteobacterias y son encontradas en ambientes con pH ácido, neutro o alcalino. El amplio rango de estados de oxidación del azufre (de -2 a +6) ha propiciado la aparición de una gran variedad de enzimas redox que les permiten oxidar diferentes compuestos inorgánicos de azufre. Sin embargo, en la actualidad, no se sabe con claridad cuáles de estas enzimas y rutas metabólicas usan los microorganismos para oxidar diferentes compuesto azufrados a diferentes pHs o concentraciones de oxígeno, ya sea en ambientes naturales o en biorreactores. Un mejor conocimiento de estas enzimas y rutas permitiría optimizar las condiciones de las reacciones de sulfoxidación y mejorar la actividad catalítica de estos microorganismos para su aplicación a bioprocesos industriales. En el caso de la corrosión microbiana, se podrían diseñar inhibidores específicos de la actividad sulfoxidante.

Palabras clave: Bacterias sulfoxidantes, metabolismo de la sulfoxidación, enzimas redox, eliminación de sulfuro, corrosión microbiana.

Abstract

The oxidation of inorganic reduced sulfur compounds to elemental sulfur and sulfate by chemolithotrophic bacteria has practical importance in the removal of sulfide in effluents, in the microbial corrosion of concrete and in biomining. Inorganic sulfur compounds are exclusively oxidized by bacteria and archaea. Sulfur-oxidizing bacteria mainly belong to the Gammaproteobacteria and are found in environments with acidic, neutral or alkaline pH. The wide range of sulfur oxidation states (from -2 to +6) has favored the emergence of a variety of redox enzymes able to oxidize different inorganic sulfur compounds. However, at the present time, it is not clear which enzymes or pathways are used to oxidize different sulfur compounds at different pH or oxygen concentration, either in natural environments or in bioreactors. A better knowledge of these enzymes and pathways would allow the optimization of sulfoxidation reaction conditions and improve the catalytic activity of these microorganisms for their application in industrial bioprocesses. In the case of microbial corrosion, specific inhibitors of the sulfur-oxidizing activity could be designed.

Keywords: Sulfur-oxidizing bacteria, sulfoxidation metabolism, redox enzymes, sulfide removal, microbial corrosion.

Introducción

El azufre es el décimo elemento más abundante en la corteza terrestre. Se encuentra naturalmente en la cercanía de aguas termales, zonas volcánicas, minas y agua de mar en forma de minerales de sulfato (yeso, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), minerales de sulfuro (pirita, FeS_2), azufre elemental (S^0) y sulfato (SO_4^{2-}) [1].

Bioquímicamente, el azufre es muy importante dado que es abundante en todos los organismos, donde aparece en compuestos orgánicos como aminoácidos, proteínas, hormonas, lípidos y vitaminas, entre otros. La materia orgánica viva y muerta constituye un reservorio menor de azufre pero de rápido reciclado [2]. En contraste, los compuestos inorgánicos de azufre, tienen un papel biológico más restringido, sirviendo como fuente de azufre para su asimilación e incorporación en los compuestos orgánicos o son empleados como donadores o aceptores de electrones en el transporte desasimilativo durante los procesos de respiración y fotosíntesis de algunos procariontes [3].

Químicamente las reacciones oxido-reductivas de los compuestos azufrados son complejas debido a que los átomos de azufre existen en 9 estados de oxidación desde (+6) hasta (-2) (Tabla I). Los 3 estados de oxidación más abundantes en la naturaleza son: -2 en forma del anión sulfuro de hidrógeno (HS^-), 0 en forma de azufre elemental (S^0) y +6 en forma de SO_4^{2-} [4].

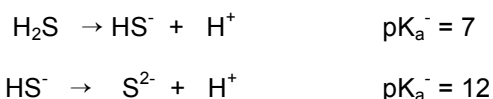
Tabla I. Estados de oxidación del azufre en algunos compuestos inorgánicos (adaptado de [4]).

Estado de oxidación	Compuestos y fórmula
-2	ácido sulfhídrico (H ₂ S), sulfuro de hidrógeno (HS ⁻), sulfuro (S ²⁻), azufre terminal del tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻)
-1	azufre terminal de los polisulfuros (⁻ S-S _n -S ⁻) y del tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻)
0	azufre elemental (S _n), azufre interno de los politionatos (⁻ O ₃ S-S _n -SO ₃ ⁻)
+4	sulfito (SO ₃ ²⁻), bisulfito (HSO ₃ ⁻)
+5	azufre en la sulfona de los politionatos (⁻ O ₃ S-S _n -SO ₃ ⁻) y azufre interno del tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻)
+6	sulfato (SO ₄ ²⁻)

Ciclo biogeoquímico del azufre

En el planeta, los compuestos azufrados circulan entre el suelo, los océanos, la atmósfera y la materia viva, a través de reacciones descritas en el llamado ciclo biogeoquímico del azufre (Fig. 1). El azufre experimenta transformaciones cíclicas en su estado de oxidación de -2 (HS⁻) a +6 (SO₄²⁻), debido a procesos químicos, geológicos y biológicos.

Una parte importante de la movilidad de los compuestos de azufre se debe a que pueden encontrarse como gases o disueltos en líquidos y así transportarse en la naturaleza. Por ejemplo el H₂S, que es un gas a condiciones normales, se encuentra como ácido o base según el pH de la solución según los siguientes equilibrios:



Siendo las sales mucho más solubles que el H₂S, la cantidad disuelta en agua puede variar según el pH de la solución. De esta forma, una solución a pH=10 puede contener 1000 veces más de sulfuros totales que a pH=4,

Las bacterias desempeñan un importante papel en este ciclo, tanto en su parte reductiva como en su parte oxidativa [6]. Las bacterias oxidantes de azufre y sulfuros producen SO₄²⁻ mientras que las bacterias sulfato-reductoras lo consumen utilizándolo como aceptor de electrones en su respiración anaerobia y produciendo H₂S.

Bacterias quimiolitotóxicas sulfoxidantes

Los compuestos inorgánicos reducidos de azufre son oxidados casi exclusivamente por procariontes [7]. Los procariontes sulfoxidantes son filogenéticamente diversos. El dominio Arquea está restringido a los miembros del orden Sulfolobales (hipertermófilas) y en el dominio Bacteria, el azufre es oxidado por litótrofos aerobios o por fotótrofos anaerobios. Adicionalmente,

algunos microorganismos heterótrofos, incluyendo bacterias y hongos, tienen la capacidad de oxidar compuestos reducidos de azufre.

La oxidación de compuestos inorgánicos reducidos de azufre por bacterias quimiolitioautótrofas es parte vital del ciclo biogeoquímico del azufre en el medio ambiente. Además, este tipo de reacciones tienen importancia en el tratamiento de la contaminación por compuestos de azufre, en corrosión y en minería. La Figura 2 muestra un árbol filogenético de bacterias quimiolitioautótrofas sulfoxidantes construido a partir de la comparación de secuencias del gen 16S rRNA y con énfasis en aquellas bacterias de importancia práctica. En su gran mayoría estas bacterias pertenecen a la clase de las Gammaproteobacterias.

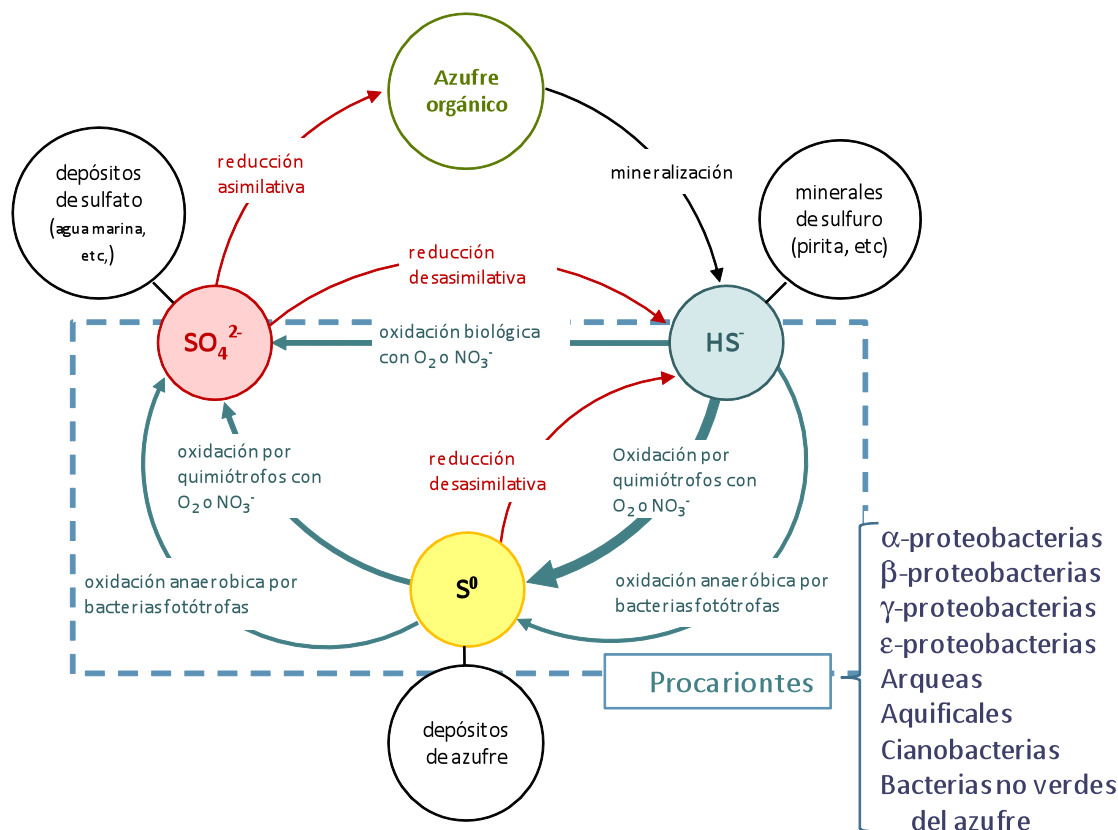


Figura 1. Ciclo del azufre (adaptado de [5]).

Las bacterias quimiolitioautótrofas obtienen su energía de la oxidación de donadores de electrones inorgánicos y fijan el CO₂ por el ciclo de Calvin (Fig. 3). La mayoría de las bacterias sulfoxidantes usan oxígeno molecular (O₂) como aceptor final de electrones. Algunas especies, como *Thiobacillus denitrificans*, son también capaces de usar nitrato (NO₃⁻) en condiciones anaerobias como aceptor final de electrones [5].

Las fuentes de donadores de electrones inorgánicos son diversas y abundantes en la naturaleza; pueden ser de origen geológico, biológico y antropogénico. La actividad volcánica es una importante fuente de compuestos inorgánicos reducidos de azufre al igual que la sulfato-reducción. Las actividades derivadas de la agricultura y minería así como la quema de combustibles fósiles y otras actividades industriales liberan compuestos inorgánicos reducidos de

azufre al medio ambiente, los cuales pueden ser utilizados como donadores de electrones por las bacterias quimiolitautótrofas sulfoxidantes.

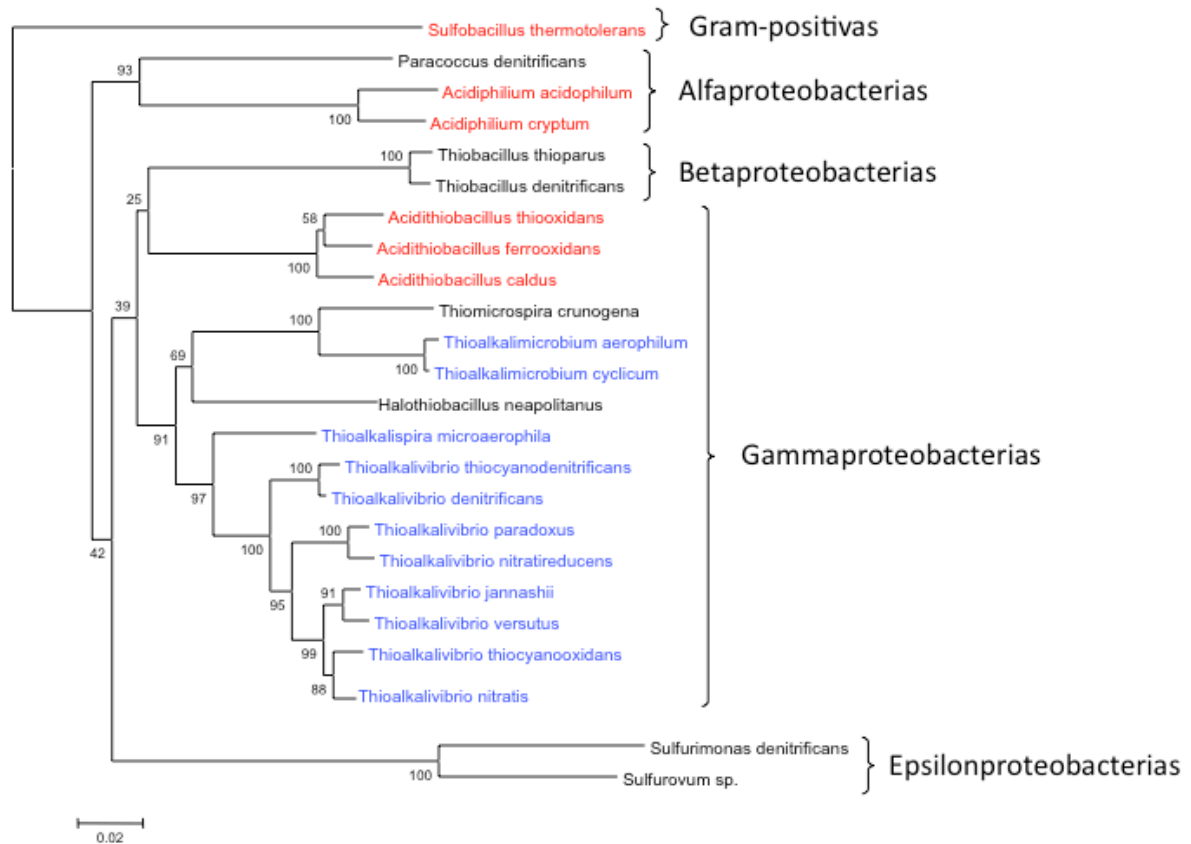


Figura 2. Árbol filogenético basado en el alineamiento de secuencias del gen 16S rRNA de bacterias quimiolitautótrofas sulfoxidantes. Se incluyeron también las secuencias del mixótrofo *Pantotrofus denitrificans* y de heterótrofos del género *Acidiphilium*. En rojo se indican las bacterias acidófilas, en azul las bacterias alcalófilas y haloalcalófilas y, en negro, las neutrófilas.

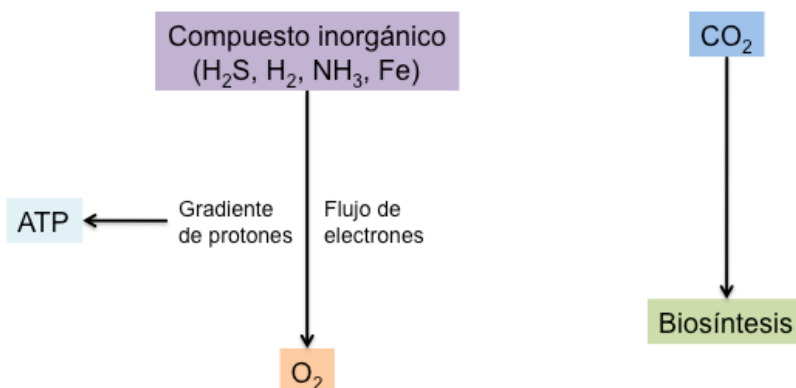
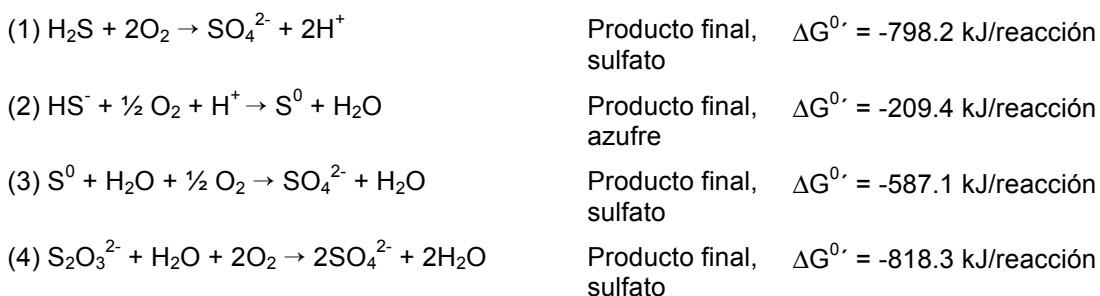


Figura 3. Energía y flujo de carbono en el metabolismo quimiolitotrófico (adaptado de [6]).

Los compuestos de azufre más comunes que pueden ser utilizados como fuentes de energía son el H₂S, el S⁰ y el S₂O₃²⁻. En la mayoría de los casos, el producto final de la oxidación del H₂S es el SO₄²⁻ y el cambio de estado de oxidación es de 8. Se libera menos energía cuando se utilizan compuestos de azufre con estados de oxidación intermedios [6]:



Las bacterias sulfoxidantes quimiolitotróficas se desarrollan óptimamente en una amplia variedad de hábitats, a altas temperaturas y condiciones ácidas (exclusivamente termófilos Gram positivos del género *Sulfobacillus*) y en condiciones mesofílicas a pH ácido, neutro o alcalino para todas las demás bacterias (Proteobacterias) (Fig. 2 y Tabla II) [7]. La Figura 4 muestra algunas bacterias sulfoxidantes quimiolitotróficas y los hábitats en donde se desarrollan.

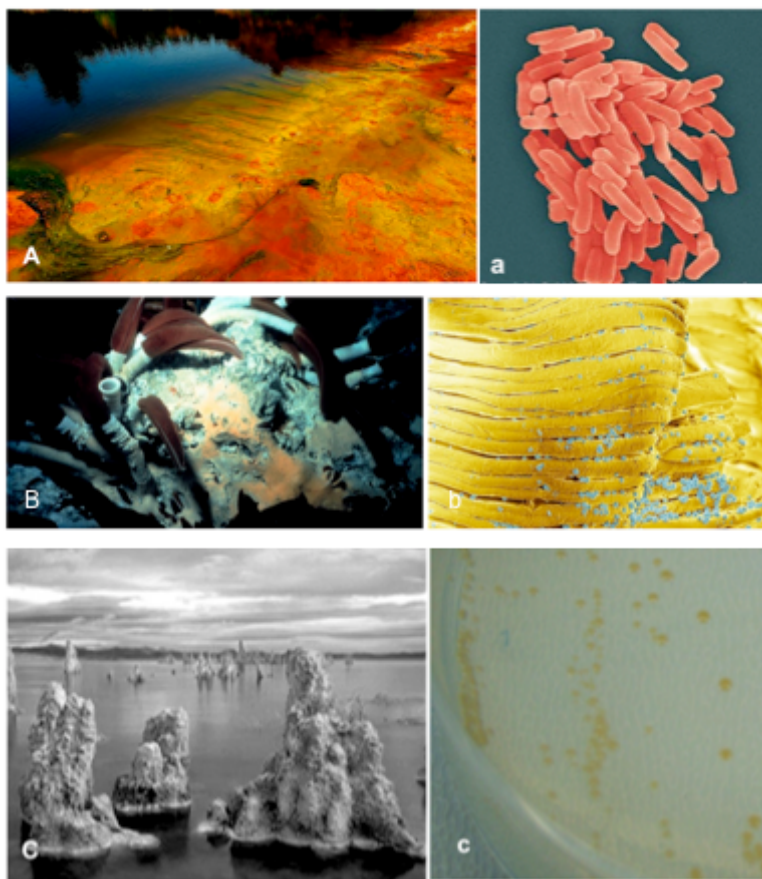


Figura 4. Distintos hábitats donde se desarrollan bacterias quimiolitautótrofas sulfoxidantes. A) Río Tinto, España, a) micrografía de *Aciditobacillus ferrooxidans*; B) Fuentes hidrotermales, b) en azul bacterias sulfoxidantes endosimbióticas de gusanos anélidos; C) Lago Mono, EU, c) morfología colonial de *Thioalkalivibrio jannaschii*.

Recientemente tres nuevos géneros de bacterias quimiolitautótrofas sulfoxidantes han sido descritos provenientes de lagos alcalino-sódicos de Asia Central, África y América del Norte: *Thioalkalimicrobium*, *Thioalkalivibrio* y *Thioalkalispira* [8]. Estos organismos son distintivos por su capacidad para crecer a pH mayores a 9 y tener actividad sulfoxidante hasta pH 11. Otra característica de estos organismos es su capacidad de crecer en ambientes salinos con concentraciones de hasta 4 M de Na^+ total. Actualmente, se estudia la capacidad del género *Thioalkalivibrio* para oxidar H_2S en condiciones haloalcalófilas, por su alto potencial para aplicarse en un proceso biotecnológico de remoción de HS^- en corrientes gaseosas [9]. Organismos similares han sido recientemente aislados en México a partir de muestras de sedimentos y aguas del ex-Lago de Texcoco en el Estado de México [10].

La Figura 5 muestra la morfología colonial de algunas bacterias quimiolitautótrofas aisladas de ambientes neutros y ácidos en concreto corroído del Sistema de Drenaje Profundo de la Ciudad de México así como en condiciones haloalcalófilas en aguas y sedimentos del ex-Lago de Texcoco. En algunas tomas se puede apreciar la acumulación de S^0 de color blanco o amarillento en las colonias.

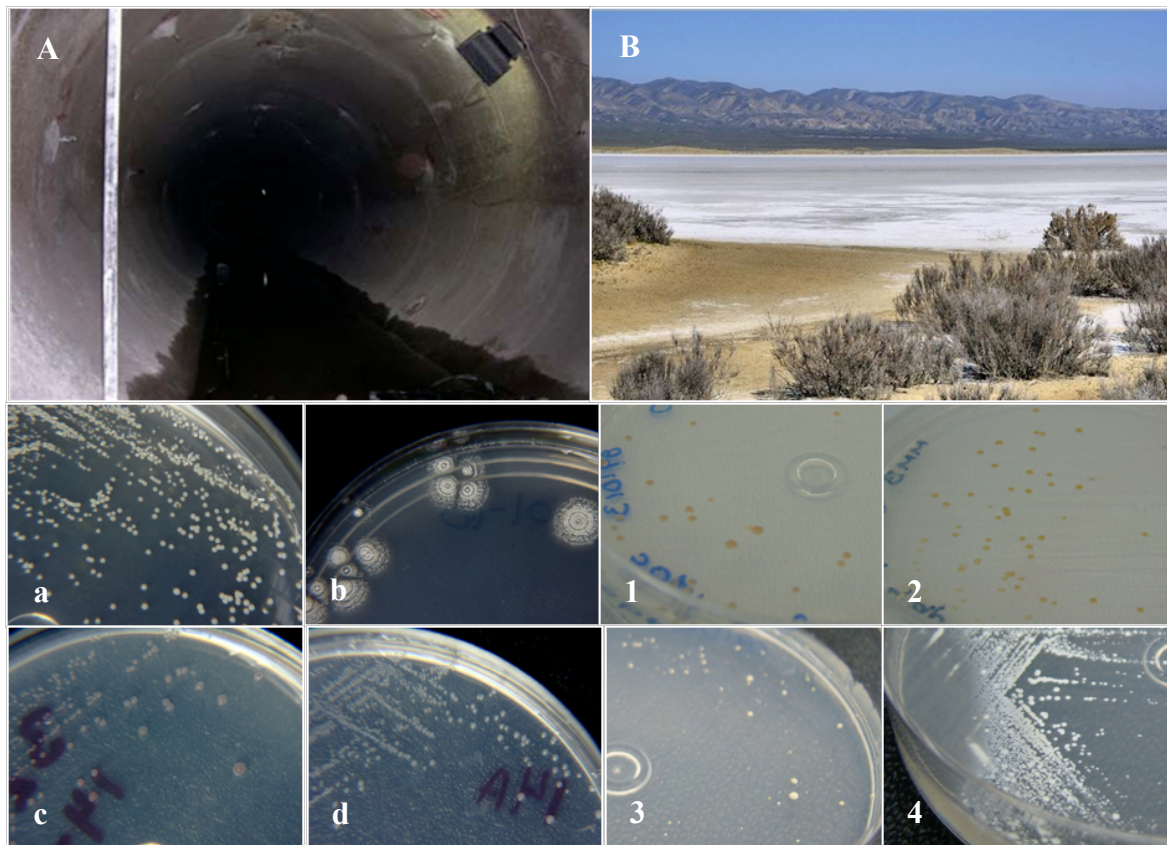


Figura 5. Sitios de muestreo y bacterias quimiolitotróficas aisladas de ambientes ácidos, neutros y alcalinos de México. A) Emisor central del Sistema de Drenaje Profundo de la Ciudad de México; (a) y (b) Aislados de muestras de concreto corroído en medio para neutrófilas; (c) y (d) Aislados de muestras de concreto corroído en medio para acidófilas. B) Ex - lago de Texcoco. (1), (2), (3) y (4) Aislados de sedimentos y aguas alcalinas en medio para bacterias haloalcalófilas.

El S^0 puede ser formado por diversas bacterias sulfoxidantes (Tabla II). El S^0 producido por estos microorganismos puede almacenarse en glóbulos de azufre, situados dentro o fuera de la célula. Los glóbulos de azufre excretados son partículas coloidales estabilizadas contra la agregación por repulsión electrostática. El S^0 formado tiene algunas propiedades que lo diferencian claramente con respecto al S^0 inorgánico. La densidad de las partículas es, por ejemplo, más baja que la densidad del azufre inorgánico y las partículas de azufre producidas biológicamente tienen características hidrofílicas mientras que el azufre ortorrómbico (S_8) se conoce por ser hidrofóbico [11].

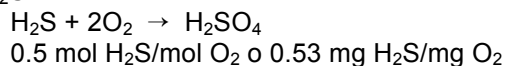
Tabla II. Características fisiológicas de algunas bacterias quimiolitotrofas sulfoxidantes de importancia aplicada.

Organismo	T óptima (°C)	pH óptimo	Glóbulos de azufre	Importancia
Bacterias Gram positivas				
Diversas especies de <i>Sulfobacillus</i>	40	1.2-2.4	No reportado	Extracción de metales en minería
Betaproteobacteria				
<i>Thiobacillus denitrificans</i>		6.8 – 7.4	Extracelulares, finamente dispersados	Tratamiento de la contaminación de aguas por compuestos de azufre y nitratos en condiciones anóxicas
<i>Thiobacillus thioparus</i>		6-8	Extracelulares	Tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con azufre
Gammaproteobacteria				
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	25 - 30	2-6	Extracelulares	Drenaje ácido de minas, extracción de metales, corrosión de metales y concreto
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>		2-5	Extracelulares	Drenaje ácido de minas, extracción de metales, corrosión de concreto
<i>Thioalkalivibrio</i> sp.		7.5-10.5	Extracelular	Tratamiento de biogás y emisiones gaseosas contaminadas con azufre

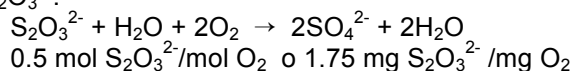
Actividad sulfoxidante

La técnica de respirometría se basa en el consumo de O₂ como una medida indirecta de la actividad sulfoxidante de las bacterias. Los cálculos de las tasas relativas de oxidación a partir de la velocidad de consumo del O₂ (qO₂) consideran los siguientes factores de la relación sustrato azufrado/O₂ de acuerdo a la estequiometría de la oxidación:

Para H₂S:



Para S₂O₃²⁻:



En las figuras 4 y 5 se muestra el efecto del $S_2O_3^{2-}$ y del HS^- como fuentes de energía en el consumo de O_2 para *Thiomicrospira crunogena* TH-55 y *Halothiobacillus neapolitanus* c2. En los resultados presentados, el efecto de la oxidación química de los compuestos azufrados fue restado de la velocidad de reacción global. *T. crunogena* es una bacteria originaria de fosas marinas hidrotermales profundas. Es la bacteria quimiolitotrofa con la tasa de crecimiento más alta reportada hasta ahora. *H. neapolitanus* c2 es procedente de aguas azufradas. Es la bacteria modelo en estudios de estructura y función de carboxisomas. Estas dos bacterias tienen su genoma completamente secuenciado.

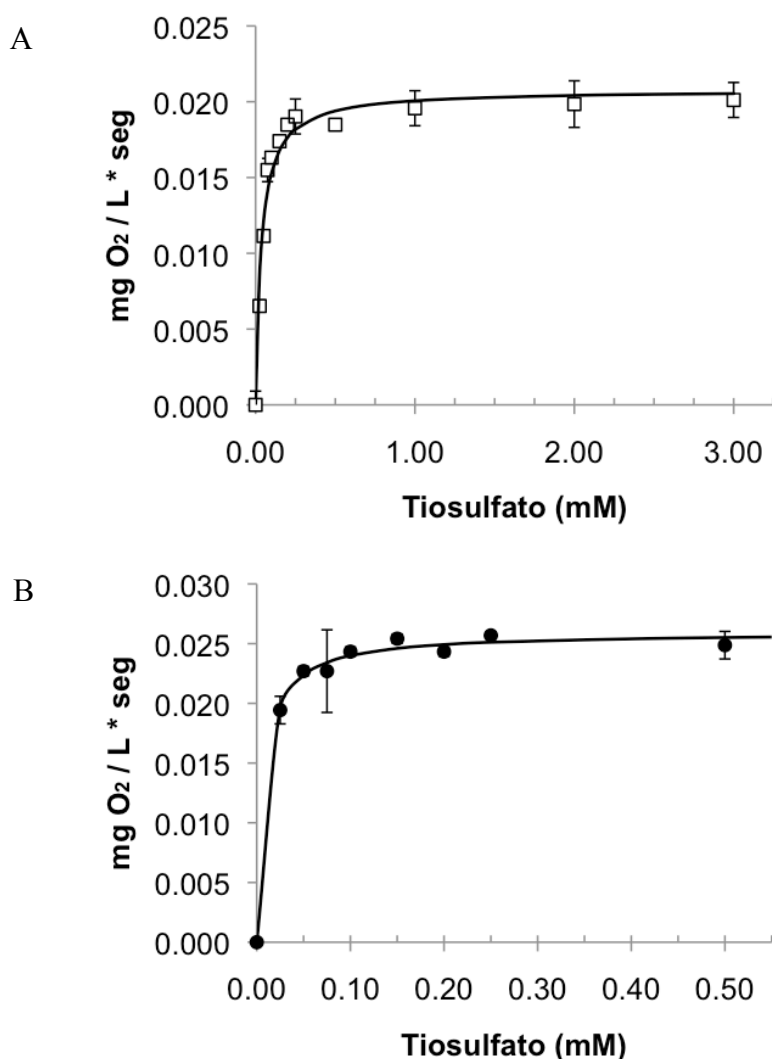


Figura 6. Consumo de O_2 para (A) *T. crunogena* TH-55 y (B) *H. neapolitanus* c2 en presencia de $S_2O_3^{2-}$.

Al incrementar la concentración de $S_2O_3^{2-}$ en el intervalo de 0 a 0.1 mM, las qO_2 tienen un comportamiento de orden 1 mientras que al incrementar la concentración de 0.25 a 3 mM, las tasas se mantienen constantes (reacción de orden cero), debido a la saturación de los sistemas enzimáticos (Fig. 6). No se presentó inhibición en presencia de este compuesto azufrado.

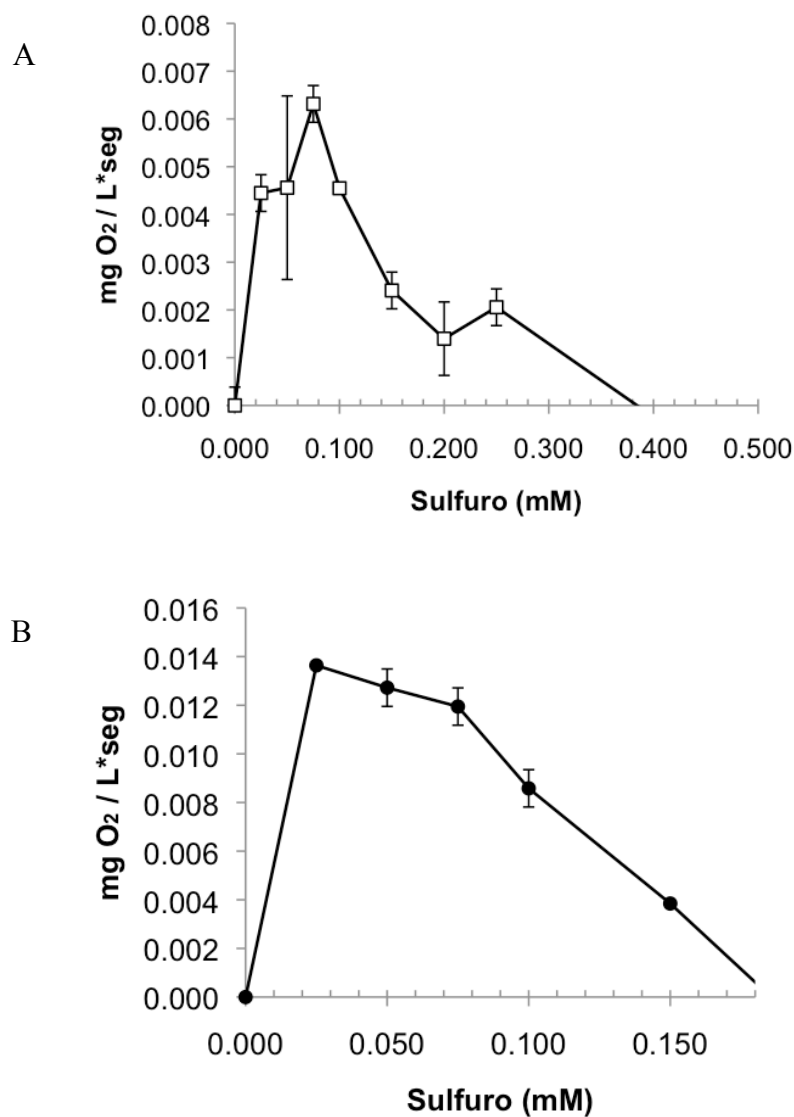


Figura 7. Consumo de O₂ para (A) *T. crunogena* TH-55 (□) y (B) *H. neapolitanus* c2 (●) en presencia de HS⁻.

A concentraciones de HS⁻ mayores a 0.025 mM para *H. neapolitanus* c2 y mayores a 0.075 mM para *T. crunogena* TH-55 se presenta un efecto inhibitorio de la oxidación (Figura 7). El HS⁻ es un inhibidor del crecimiento celular debido a que reacciona con metales, en particular con el hierro contenido en los citocromos [12].

El sulfuro es un compuesto volátil en condiciones ácidas y muy soluble como sales (HS⁻ y S²⁻) en agua en condiciones alcalinas. Por lo tanto, es interesante llevar a cabo la sulfoxidación en condiciones alcalinas. Con el fin de obtener bacterias sulfoxidantes alcalófilas para la oxidación del sulfuro, se buscó un punto de muestreo a nuestro alcance, el ex-Lago de Texcoco, que presenta las características de un lago alcalino-sódico. El consorcio C1 se obtuvo mediante

un proceso de enriquecimiento a partir de la mezcla de muestras de suelos del ex-Lago de Texcoco, en un medio mineral específico para bacterias alcalófilas quimiolitotrofas sulfoxidantes (con $S_2O_3^{2-}$ como donador de electrones y un amortiguador de carbonatos de pH 10.2) [13]. El efecto del pH sobre la actividad sulfoxidante del consorcio C1 en presencia de $S_2O_3^{2-}$ o HS^- se estudió por respirometría a distintos valores de pH (Fig. 8).

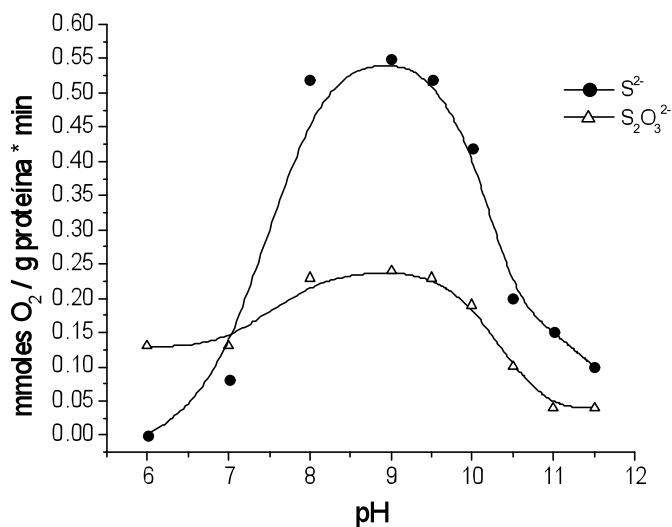


Figura 8. Efecto del pH sobre el consumo de O₂ por el consorcio C1 en presencia de $S_2O_3^{2-}$ y S^{2-} .

Como se observa en la figura anterior, tanto para el HS^- como para el $S_2O_3^{2-}$ la qO_2 más alta se encontró en un pH de 9.0, lo cual es consistente con los valores óptimos de pH reportados para los géneros descritos de bacterias alcalófilas quimiolitotrofas sulfoxidantes que tienen un intervalo óptimo de actividad sulfoxidante entre pH 9.0 y 10.2 [14].

Se muestra ahora el efecto del $S_2O_3^{2-}$ (Fig. 9) y del HS^- (Fig. 10) como fuentes de energía en la actividad sulfoxidantes del consorcio C1. Al incrementar la concentración de $S_2O_3^{2-}$ en el intervalo de 0 a 0.3 mM, la tasa de consumo de O₂ tiene un comportamiento de orden 1. Al incrementar la concentración de 0.3 a 5 mM, las tasas de consumo de O₂ se mantienen constantes (reacción de orden cero), debido a la saturación de los sistemas enzimáticos. No se presenta inhibición de la actividad sulfoxidante con este compuesto azufrado. En presencia de HS^- se presenta una inhibición de la actividad sulfoxidante. Los resultados indican que al aumentar la concentración de 0 a 0.3 mM, el comportamiento es de orden 1. Mientras que en el intervalo de concentración de 0.3 a 1.5 mM, la reacción es de orden cero. Finalmente a una concentración mayor a 1.5 mM se presenta un efecto inhibitorio de la oxidación.

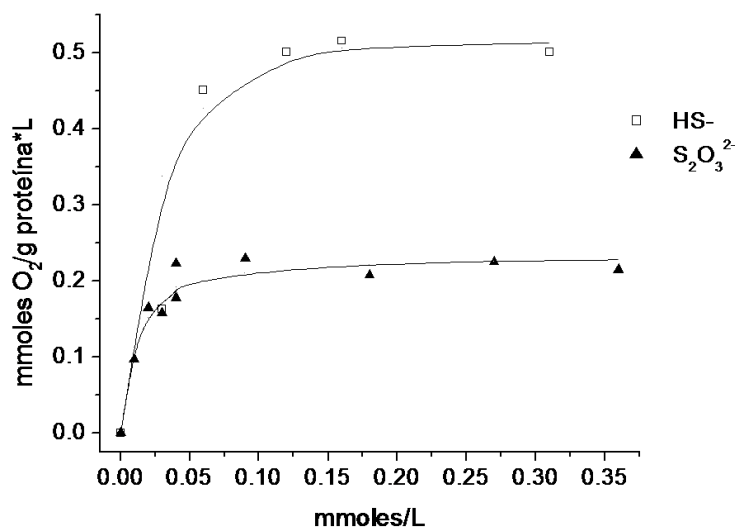


Figura 9. Capacidad sulfoxidante del consorcio C1 con S₂O₃²⁻.

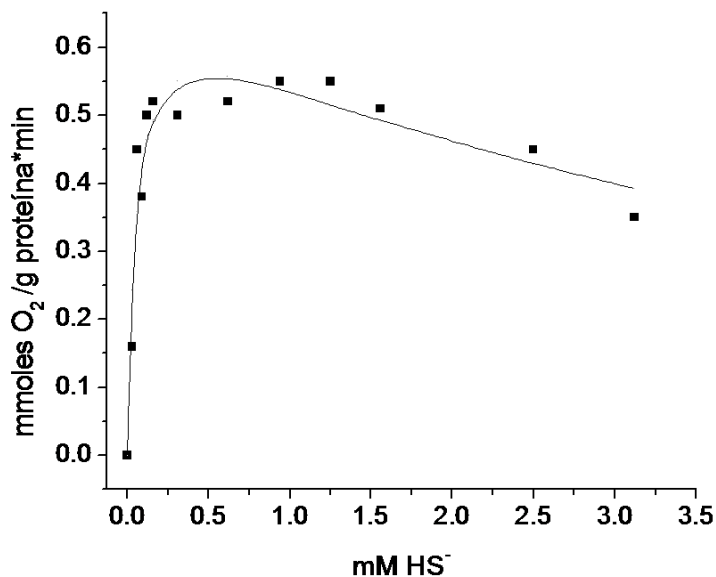


Figura 10. Capacidad sulfoxidante del consorcio C1 con HS⁻.

Relevancia ambiental y biotecnología

Si bien el azufre es esencial para la vida celular, este elemento forma también parte de importantes problemas ambientales, como consecuencia de un desequilibrio de su ciclo biogeoquímico natural, debido a emisiones antropogénicas excesivas de compuestos azufrados que rebasan la capacidad de la naturaleza para degradarlos [5,15]. Entre los compuestos de azufre de mayor importancia que se emiten a la atmósfera se encuentran diversos compuestos inorgánicos como el dióxido de azufre (SO₂), el sulfuro (H₂S) y el disulfuro de carbono (CS₂).

Cerca de un tercio de todos los compuestos de azufre, y 99% del SO_2 , que llegan a la atmósfera provienen de las actividades humanas.

El H_2S es un importante contaminante ambiental, que pese a los esfuerzos globales se encuentra entre los compuestos reducidos de azufre más emitidos al medio ambiente. El H_2S es un gas incoloro altamente reactivo, corrosivo y tóxico, con olor característico a huevos podridos. El H_2S se encuentra de forma natural en los gases de los volcanes, manantiales de azufre, emanaciones de grietas submarinas, pantanos, petróleo crudo, gas natural y como producto de la degradación biológica anaerobia de la materia orgánica en pantanos, ciénagas y llanuras cubiertas por las mareas. Las fuentes industriales engloban a una gran cantidad de industrias: producción y transporte de petróleo y gas, refinerías, plantas de gas natural, plantas petroquímicas, hornos de coque, industria alimentaria, industria del papel, curtidurías, plantas depuradoras de aguas residuales, etc. [15]. Además de estos efectos, es nocivo para las vías respiratorias y produce olores que afectan a la calidad de vida de las personas. Por otra parte, sus propiedades corrosivas ocasionan daños en infraestructura industrial tanto en procesos donde se libera este gas, como en aquellos procesos diseñados para removerlo, provocando indirectamente el deterioro de paredes de concreto en plantas de tratamiento de aguas, reactores y sistemas de drenaje; corroyendo tuberías, tanques, válvulas y bombas de acero. Por lo que la eliminación y manejo del H_2S , es tanto un problema de salud, ambiental y alto impacto económico.

La emisión de H_2S en los sistemas de drenaje debido a la actividad de las bacterias sulfato-reductoras esta indirectamente asociada a la corrosión del concreto (Fig. 11).

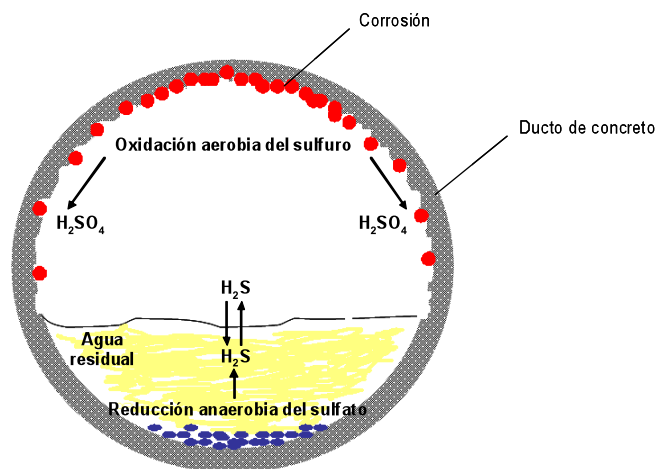


Figura 11. Sección transversal mostrando la corrosión de un ducto de drenaje debido a la acción de microorganismos.

El H_2S es poco soluble en soluciones ácidas como los son las aguas residuales (pH 5-6) y por lo tanto el H_2S generado por sulfatoreducción en las aguas residuales, ricas en materia orgánica, es emitido del agua hacia al espacio libre del ducto. El concreto es un material alcalino y el H_2S es mucho más soluble en condiciones alcalinas y se disuelve en el condensado formado sobre la superficie del concreto expuesto donde será convertido en SO_4^{2-} por bacterias quimilolitoautótrofas sulfoxidantes neutrófilas y posteriormente acidófilas. El SO_4^{2-} producido al combinarse con agua forma ácido sulfúrico (H_2SO_4) que acidifica progresivamente el concreto y lo disuelve formando yeso y etringita ($3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{CaSO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ o $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 3\text{CaSO}_4\cdot 31\text{H}_2\text{O}$) que se expande provocando la formación de fisuras y picaduras hasta debilitar la integridad estructural de los ductos y conducir a eventuales fallas y posible colapso. Este fenómeno se conoce como corrosión del concreto inducida por microorganismos. En este caso es deseable encontrar soluciones para inhibir la actividad sulfoxidantes de los microorganismos. La velocidad

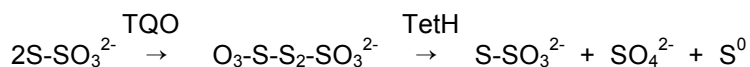
de corrosión del concreto en ductos de drenaje puede ser de 1 a 10 mm por año, lo cual puede reducir el tiempo de vida de estos sistemas a menos de 30 años en lugar de los 80-100 años que podrían ser útiles. En el condado de Los Ángeles (EU) un 10% de los ductos de drenaje son sujetos a este tipo de corrosión [16]. Hemos realizado estudios preliminares a partir de muestras de concreto corroído tomadas en diferentes puntos del Sistema de Drenaje Profundo de la Ciudad de México en el año 2008. El pH de las muestras de concreto se registró entre 7 y 2, los valores más bajos se obtuvieron para los concretos más deteriorados, donde la corrosión del concreto fue tan extensa que dejaba totalmente expuestas las barras de refuerzo del concreto. Se detectó la presencia y actividad de bacterias sulfoxidantes neutrófilas en prácticamente todas las muestras y de bacterias sulfoxidantes y oxidantes de hierro acidófilas en las muestras más ácidas (Tabla II). Los valores de pH encontrados y la presencia de bacterias sulfoxidantes muestran que el concreto del Sistema de Drenaje Profundo presenta una corrosión química y microbiológica avanzada.

Los sulfuros suelen oxidarse espontáneamente cuando se encuentran en soluciones acuosas en presencia de oxígeno. La velocidad de la reacción depende de la relación molar sulfuro-oxígeno, del pH, de la temperatura, de la fuerza iónica y de la presencia de catalizadores o inhibidores [4, 17]. Como intermediarios de la oxidación se producen principalmente S^0 , polisulfuros, sulfito y politionatos [17]. Sin embargo, en muchos casos la velocidad de las reacciones biológicas puede llegar a ser de 100 a 1000 veces mayor que las químicas [5]. Es por esta razón que en las últimas décadas los procesos biológicos para la eliminación de H_2S en efluentes industriales se han convertido en un complemento y alternativa para los procesos fisicoquímicos. Estos bioprocesos se basan en la capacidad de bacterias quimiolitautótrofas para oxidar los compuestos reducidos de azufre como el H_2S , produciéndose azufre S^0 o SO_4^{2-} (Tabla II). En estos procesos, es preferible la formación de S^0 debido a que es menos dañino que el SO_4^{2-} que formará H_2SO_4 , requiere menos neutralizante, además de que es fácil de separar por sedimentación [14,15]. Estos bioprocesos son aplicaciones benéficas del ciclo del azufre.

Enzimas y rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitautótrofas

El amplio rango de estados de oxidación del azufre (de -2 a +6) ha propiciado la aparición de una gran variedad de enzimas redox capaces de transformar diferentes compuestos de azufre. El $S_2O_3^{2-}$, uno de los compuestos reducidos de azufre inorgánico más abundante, juega un papel importante en el ciclo del azufre y es el sustrato comúnmente oxidado por todas las bacterias sulfoxidantes.

El proceso de degradación del tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) vía tetratonato ($O_3S-S_2-SO_3^-$) como intermediario implica a las enzimas tiosulfato quinona oxidorreductasa (TQO) y tetratonato hidrolasa (TetH), que parecen ser comunes en las bacterias que viven en hábitats extremos ácidos como *Acidithiobacillus ferrooxidans* [18]:



La secuencia del genoma completo de *Acidithiobacillus thiooxidans* no ha sido publicada aún por lo que no se sabe si este microorganismo comparte esta ruta metabólica para la oxidación del $S_2O_3^{2-}$.

El sistema multienzimático Sox, estudiado en la bacteria mesoneutrófila *Paracoccus denitrificans*, es común en Alfaproteobacterias fotó- y quimiótrofas que convierten el $S_2O_3^{2-}$ a SO_4^{2-} sin la formación del glóbulos de azufre como intermediario libre [19]. El modelo actual del sistema enzimático Sox abarca cuatro complejos periplasmáticos SoxXA, SoxYZ, SoxB y Sox(CD)₂ que oxidan el $S_2O_3^{2-}$ según el siguiente mecanismo (Fig. 12): SoxXA cataliza la transferencia oxidativa y covalente del azufre sulfano del $S_2O_3^{2-}$ ($S-SO_3^{2-}$) a la cisteína de la

proteína acarreadora de sustrato SoxYZ. El grupo sulfona (SO_3^{2-}) del $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ es posteriormente hidrolizado por la hidrolasa SoxB, produciendo SO_4^{2-} y posteriormente el grupo sulfano es oxidado a sulfona por Sox(CD)₂ e hidrolizado otra vez por SoxB de tal modo que es restaurado el complejo SoxYZ. La filogenia del gen *soxB*, que codifica para la tiosulfato hidrolasa, ha sido estudiada y refleja la filogenia obtenida usando como marcador el gen 16S rRNA [20,21].

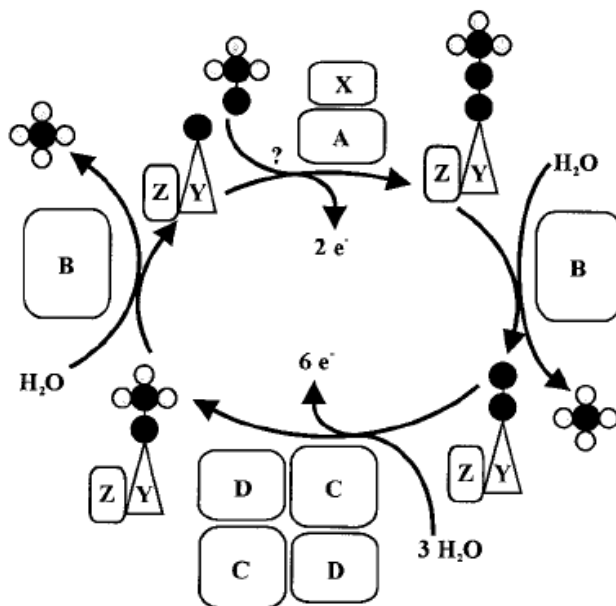
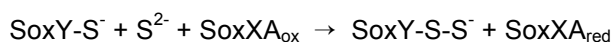


Figura 12. Sistema multienzimático Sox de *P. denitrificans* (tomado de [19]). Los círculos sólidos representan átomos de azufre y los círculos vacíos átomos de oxígeno.

Los pasos detallados de la oxidación del $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ son:

- (1) $\text{SoxY-S}^- + \text{S-SO}_3^- + \text{SoxXA}_{\text{ox}} \rightarrow \text{SoxY-S-S-SO}_3^- + \text{SoxXA}_{\text{red}}$
- (2) $\text{SoxY-S-S-SO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + \text{SoxB} \rightarrow \text{SoxY-S-S}^- + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{SoxB}$
- (3) $\text{SoxY-S-S}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{SoxCD}_{\text{ox}} \rightarrow \text{SoxY-S-SO}^- + 2\text{H}^+ + \text{SoxCD}_{\text{red}}$
- (4) $\text{SoxY-S-SO}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{SoxCD}_{\text{ox}} \rightarrow \text{SoxY-S-SO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{SoxCD}_{\text{red}}$
- (5) $\text{SoxY-S-SO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + \text{SoxCD}_{\text{ox}} \rightarrow \text{SoxY-S-SO}_3^- + 2\text{H}^+ + \text{SoxCD}_{\text{red}}$
- (6) $\text{SoxY-S-SO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + \text{SoxB} \rightarrow \text{SoxY-S}^- + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{SoxB}$

El H_2S y el S^0 pueden ser oxidados por este sistema enzimático con la siguiente primera reacción inicial y los pasos siguientes son los mismos que para el $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$:



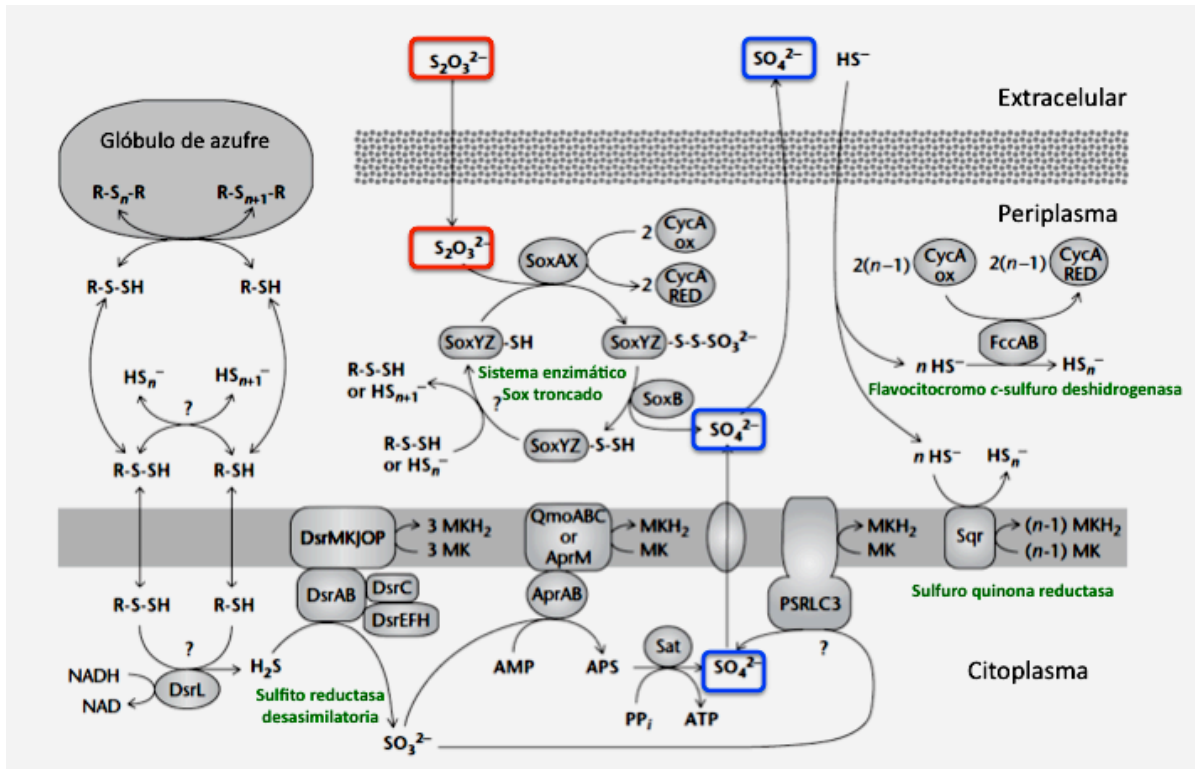


Figura 13. Posibles rutas metabólicas propuestas para la oxidación de compuestos reducidos de azufre inorgánicos. Es probable que no todas las rutas y enzimas estén presentes en un solo organismo (adaptado de [7]).

La ruta ramificada de oxidación del $S_2O_3^{2-}$ fue propuesta para aquellas bacterias que forman glóbulos de azufre intra- o extracelulares durante la oxidación del $S_2O_3^{2-}$. Esta ruta procede vía la interacción de dos sistemas enzimáticos espacialmente separados: un sistema Sox troncado sin SoxCD y proteínas codificadas en el *locus* de la sulfito reductasa desasimilatoria (Dsr) (Fig. 13). SoxXA acoplaría el $S_2O_3^{2-}$ a SoxYZ y SoxB liberaría una molécula de SO_4^{2-} de acuerdo a los pasos (1) y (2) descritos arriba para la oxidación del $S_2O_3^{2-}$ por el sistema Sox completo. Debido a la falta de SoxCD, el complejo SoxY-S-S- sería transferido a glóbulos de azufre. La oxidación del azufre almacenado en los glóbulos procedería vía la participación de las enzimas Dsr para liberar H_2S , SO_3^{2-} y finalmente SO_4^{2-} en una ruta metabólica inversa a la ruta de la sulfato-reducción.

La presencia de las proteínas Dsr y de proteínas relacionadas con la sulfato-reducción (Apr) así como la ausencia de SoxCD, ha sido generalmente detectada en bacterias que almacenan azufre [21]. Es el caso de *T. denitrificans*, donde se han podido detectar estas proteínas a partir de la secuencia completa del genoma de este microorganismo acumulador de azufre [22]. Sin embargo no es siempre el caso ya que, por ejemplo, *T. crunogena* posee el complejo Sox completo y no tiene las proteínas Dsr a pesar de que acumula azufre. En el caso de *T. thioparus*, que también acumula altas cantidades de azufre, se ha detectado la presencia de los genes que codifican para SoxB, DsrAB y AprAB por PCR, aunque no se ha reportado explícitamente la ausencia de SoxCD [20,22,23,24]. Recientemente se hizo pública, en el GenBank, la secuencia del genoma completo de dos cepas de *Thioalkalivibrio* sp. (HL-EbGR7 y K90mix) en la que hemos podido detectar la presencia de proteínas emparentadas con SoxZ, SoxY, SoxA y Dsr, por lo que en este género la oxidación de compuestos azufrados y la

acumulación de glóbulos de azufre podría ser mediante una ruta ramificada de oxidación del $S_2O_3^{2-}$.

Algunas bacterias quimiolitotóxicas utilizan una flavocitocromo c-sulfuro deshidrogenasa (Fcc) o una sulfuro quinona reductasa (Sqr) para oxidar H_2S a S^0 (Fig. 13). La Fcc no parece ser esencial para el crecimiento en presencia de H_2S [19]. Se han encontrado los genes *sqr* en una amplia variedad de bacterias quimiolitotóxicas incluyendo *A. ferrooxidans*, *T. denitrificans* y *T. crunogena* [25]. La enzima Sqr ha sido propuesta como la enzima potencialmente responsable de la oxidación de sulfuro en una amplia variedad de organismos con excepción de las plantas; esta oxidación es importante para la circulación global del sulfuro y del carbono en la interfaz óxica-anóxica de varios ambientes, así como para la tolerancia a H_2S y su detoxificación [25,26]. La menor tolerancia de *H. neapolitanus* al H_2S , comparado con *T. crunogena* (Fig. 7), quizás se debe a que no se ha detectado la presencia de Sqr al analizar el genoma completo de este microorganismo.

A. ferrooxidans puede consumir el S^0 de la siguiente manera [7]: El S^0 es activado por glutatión en forma de glutatión-sulfuro (G-SH). Este sulfuro es oxidado en el periplasma por una sulfuro dioxigenasa, produciendo sulfito que es posteriormente oxidado a sulfato por una sulfito deshidrogenasa.

La información sobre los detalles moleculares, genes, enzimas y rutas metabólicas implicadas en la oxidación de compuestos reducidos de azufre por bacterias quimiolitotóxicas de importancia aplicada es aun limitada. Estos microorganismos producen diferentes tipos de enzimas para metabolizar los compuestos azufrados. Un trabajo reciente con Gammaproteobacterias oxidantes de azufre simbiotes de moluscos mostró que, independientemente de las condiciones ambientales (aeróbico, semióxico, anaerobio), todos los genes que codifican para Dsr, Apr, SoxB, Sqr y Sat (Fig. 13) están expresándose al mismo tiempo, indicando que todas las rutas metabólicas de oxidación de azufre funcionan simultáneamente en estos organismos [27]. Un mejor conocimiento de estas enzimas y rutas permitiría mejorar las actividades catalíticas en bioprocesos benéficos (tratamiento de la contaminación por compuestos azufrados) o bien inhibirlas cuando tienen consecuencias negativas (corrosión).

Referencias

1. Maier, R.M. (2009) In *Environmental Microbiology* 2nd Ed. (Maier, R.M., Pepper, I.L. y Gerba, C.P., eds) pp. 287-318, Academic Press, San Diego, CA
2. Atlas, R. M. y Richard, B. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*, Pearson Educación, Madrid
3. Brüser, T., Lens, P. y Truper, H. (2000). The biological sulfur cycle. In *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering* (Lens, P. N. L y Hulshoff Pol, L., eds) pp. 47-85, International Water Association
4. Steudel, R. (2000). The chemical sulfur cycle. In *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering* (Lens, P. N. L y Hulshoff Pol, L., eds) pp. 1-31, International Water Association, London
5. Lens, P. N. L. y Kuenen, J. G. (2001) *Water Sci. Technol.* **44**, 57-66
6. Madigan, M.T. y Martinko, J.M. (2006) *Biology of microorganisms*, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ
7. Dhal, C., Friedrich, C. y Kletzin, A. (2008) Sulfur oxidation in prokaryotes. In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Chichester
8. Sorokin, D. Y. y Kuenen, J. G. (2005) *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 685-702

9. Sorokin, D. Y., van den Bosch, P. L. F., Abbas B., Janssen, A. J. H. y Muyzer, G. (2008) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 965–975
10. Granada, C., Revah, S. y Le Borgne, S. (2009) *Adv. Mat. Res.* **71-73**, 137-140
11. Kleinjan, W. (2005) Biologically produced sulfur particles and polysulfide ions: Effects on a biotechnological process for the removal of hydrogen sulfide from gas. Tesis de Doctorado Wageningen Universiteit, Holand
12. O’Flaherty, V. y Collieran, E. (2000). Sulfur problems in anaerobic digestion. In *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering* (Lens, P. N. L y Hulshoff Pol, L., eds) pp. 467-489, International Water Association, London.
13. Sorokin, D. Y., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., Tourova, T. P., Jones, B. E., Rainey L. A. y Kuenen G. J. (2001). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **51**, 565-580
14. Sorokin, D. Y., Robertson, L. A. y Kuenen, J. G. (2000). *Antonie Van Leeuwenhoek* **77**, 251-262
15. Janssen, A. J. H., Ruitenberg, R. y Buisman, C.J.N. (2001). *Water Sci. Technol.* **44**, 85-90
16. Zhang, L., De Schryver, P., De Gussemé, B., De Muynck, W., Boon, N. Y. y Verstraete, W. (2008) *Water Res.* **42**, 1-12
17. González-Sánchez, A. y Revah, S. (2007) *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 292–298
18. Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D.S. y Bonnefoy, V. (2009) *BMC Genomics* **10**, 394-413
19. Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. y Fischer J. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2873-2882
20. Petri, R., Podgorsek, L. y Imhoff J.F. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* **197**, 171-178
21. Meyer, B., Imhoff, J.F. y Kuever, J. (2007) *Environ. Microbiol.* **9**, 2957-2977
22. Beller, H.R., Chain, P.S., Letain, T.E., Chakicherla, A., Larimer, F.W., Richardson, P.M., Coleman, M.A., Wood, A.P. y Kelly, D.P. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 1473-1488
23. Loy, A., Duller, S., Baranyi, C., Mußmann, M., Ott, J., Sharon, I., Béjà, O., Le Paslier, D., Dahl, C. y Wagner M. (2009) *Environ. Microbiol.* **11**, 289–299
24. Meyer, B. Y Kuever, J. (2007) *Microbiology* **153**, 3478–3498
25. Pham, V, H., Yong, JJ., Park, SJ., Yonn, DN., Chung, WH. y Rhee, SK (2008) *Microbiology* **154**, 3112-3121
26. Hell, R., Dahl, C., Knaff, D.B. y Leustek, T. (2008) *Sulfur metabolism in phototrophic organisms*, Springer, Dordrecht, Holanda
27. Harada, M., Yoshida, T., Kuwahara, H., Shimamura, S., Takaki, Y., Kato, C., Miwa, T., Miyake, H. y Maruyama, T. (2009) *Extremophiles* **13**, 895-903

Semblanza de la Dra. Sylvie Le Borgne



Formación: 1994, Doctorado en Biotecnología – Microbiología, Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse, Francia. 1991, Maestría en Biotecnología – Microbiología, Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse. 1991, Licenciatura en Ingeniería Bioquímica y Genética Microbiana, Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse. Realizó una estancia postdoctoral en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en el laboratorio de los Drs. Fernando Valle y Francisco Bolívar (1994-1997). Trabajó como Investigadora Asociada del Dr. Agustín López-Munguía en el mismo Instituto de Biotecnología (1997-1999). De 1999 a 2005, fue Investigadora del Programa de Biotecnología del Instituto Mexicano del Petróleo. Actualmente, es Profesora Investigadora Titular C del Departamento de Procesos y Tecnología de la UAM Cuajimalpa. Su trabajo ha sido publicado en revistas indexadas de carácter internacional y ha sido también presentado en congresos internacionales. Tiene el nivel I del Sistema Nacional de Investigadores. Obtuvo el Premio Carlos Casas Campillo 2004 por parte de la

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería otorgado a jóvenes profesionales de menos de 35 años por su contribución al desarrollo de la Biotecnología o de la Bioingeniería en México.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 121-133. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

BIOQUÍMICA DE LA SELENOCISTEÍNA, EL 21er AMINOÁCIDO, Y ROL DE LAS SELENOPROTEÍNAS EN LA SALUD HUMANA

Gustavo Salinas

Departamento de Biociencias de la Facultad de Química, Universidad de la República.
Instituto de Higiene, Avda. A. Navarro 3051, Piso 2, Montevideo, Uruguay
gsalin@fq.edu.uy

Resumen

El selenio es un elemento traza esencial para el ser humano. La importancia de este elemento se debe a las selenoproteínas, un conjunto discreto de proteínas, que poseen el inusual aminoácido selenocisteína; un análogo de la cisteína, que contiene selenio en lugar de azufre. La selenocisteína es incorporada a la síntesis ribosomal de proteínas mediante un mecanismo específico, montado sobre el aparato traduccional canónico, que permite la decodificación de codones UGA como selenocisteína. La selenocisteína es un aminoácido más reactivo que la cisteína, que, en las selenoproteínas de función conocida, está siempre involucrado en la catálisis redox. El selenoproteoma del ser humano consta de 25 proteínas. Si bien no se conoce la función de todas las selenoproteínas, en los últimos años se ha avanzado sustancialmente en dilucidar las funciones de muchas de ellas. Las selenoproteínas son importantes en el mantenimiento de la homeostasis redox (debido a las selenoproteínas de los sistemas de la tiorredoxina y del glutatión), en el metabolismo de las hormonas tiroideas (debido a las tironina deiodinasas), en la maduración de los espermatozoides (debido principalmente a una de las glutatión peroxidases), y en la función muscular (debido principalmente a la selenoproteína N), entre otros procesos fisiológicos. Finalmente, se reseñan los estudios realizados sobre la tiorredoxina glutatión reductasa de platelmintos parásitos. En los últimos años hemos contribuido a dilucidar los mecanismos catalíticos de las diferentes actividades que posee esta singular selenoproteína multifuncional que ejerce el control global de la homeostasis redox de los parásitos platelmintos.

Palabras clave: Selenocisteína, selenoproteínas, selenio, enzimas antioxidantes, tiorredoxina glutatión reductasa.

Abstract

Selenium is an essential trace element for humans. Its importance is due to selenoproteins, a discrete set of proteins possessing the rare amino acid selenocysteine, an analog of cysteine, which contains selenium instead of sulfur. Selenocysteine is incorporated into proteins by a specific mechanism, superimpose on the canonical translational apparatus, which allows UGA codons to be decoded as selenocysteine. Selenocysteine is more reactive than cysteine, and in selenoproteins of known function is always involved in redox catalysis. The human selenoproteome consists of 25 proteins. In recent years important advances have been made in elucidating the function of many selenoproteins, although specific functions have not been ascribed to all of them. Selenoproteins are important in maintaining redox homeostasis (due to selenoproteins of the thioredoxin and glutathione systems), metabolism of thyroid hormones (due to thyronine deiodinases), sperm cells maturation (mainly due to one of the glutathione peroxidases), and muscle function (mainly due to selenoprotein N), among other physiological processes. Finally, studies on thioredoxin glutathione reductase from flatworm parasites are summarized. In the last years, we have contributed to elucidate the catalytic mechanisms underlying the different activities of this unique multifunctional selenoprotein, which controls the overall flatworm parasites redox homeostasis.

Keywords: Selenocysteine, selenoproteins, selenium, antioxidant enzymes, thioredoxin glutathione reductase.

Un poco de historia del Selenio: de elemento tóxico a micronutriente

El elemento selenio (Se) fue descubierto en 1817 por J.J. Berzelius, investigando la causa de una enfermedad que padecían trabajadores de la industria de la producción de ácido sulfúrico a partir de piritas. Mucho antes, Marco Polo había reportado en sus crónicas de viajes lo que, retrospectivamente, habrían sido los efectos de la intoxicación de caballos por ingestión de altas dosis selenio acumulado en determinadas plantas nativas de una región de China: las pezuñas de los caballos se debilitaban y caían. Muchos siglos después, en Nebraska se describe un síndrome similar al reportado por Marco Polo, y posteriormente, se identificó al Se como el componente tóxico. Los esfuerzos iniciales de investigación fueron dirigidos a evitar la toxicidad por selenio. Rápidamente se reconoció la existencia de suelos ricos en Se y la existencia de ciertas plantas que acumulan este elemento (revisado en [1,2]). En 1957, la mala reputación del Se cambió en la comunidad científica y en el público en general, gracias a los trabajos de K. Schwarz: estudiando la levadura como fuente de proteínas, notó que el cambio de levadura de cerveza por la levadura de tórula (conocida también como levadura forrajera) en la alimentación de las ratas provocaba necrosis en el hígado, de lo que dedujo que uno o más componentes esenciales estaban presentes en una levadura y no en la otra. Entre estos componentes se identificó el denominado “factor 3”, que inequívocamente contenía selenio [3]. El selenio fue rápidamente reconocido como un elemento traza esencial en mamíferos, y su deficiencia como causa de algunas enfermedades [1,2]. La enfermedad del músculo blanco, una distrofia muscular que afectaba al ganado en crecimiento se asoció a suelos deficientes en Se y pudo prevenirse con la suplementación con Se. La deficiencia de Se fue posteriormente asociada a otras afecciones, como la infertilidad en machos. A mediados de la década de los 1970s, se demostró

que una cardiomiopatía humana, denominada enfermedad de Keshan, endémica en la provincia homónima de China, estaba asociada a la dieta deficiente de Se, debido a suelos muy pobres en selenio, siendo el virus de Coxsackievirus un cofactor de esta enfermedad: un ambiente deficiente en Se en el tejido del corazón parece seleccionar una variante cardiovirulenta de estos virus. Esta enfermedad, que tiene síntomas en común con la enfermedad del músculo blanco en animales, se trata y se previene con la suplementación con Se. La enfermedad de Kashin Beck, una artritis deformante es también asociada a dietas pobres en selenio en ciertas regiones de Asia; la deficiencia de yodo sería un cofactor de esta enfermedad. Recapitulando esta perspectiva histórica podemos decir que el margen entre niveles tóxicos de Se y niveles dietarios requeridos para prevenir deficiencias en Se es estrecho. La distribución desigual de Se en la corteza terrestre puede entonces acarrear problemas de salud tanto por exceso como por déficit del este elemento traza.

Las pistas iniciales relacionadas con la funciones específicas del Se provinieron del lado de la enzimología: los trabajos de J.T. Rotruck y col. [4] y de L. Flohe y col. [5] de 1973 determinaron que la glutatión peroxidasa de mamíferos, una enzima que reduce peróxido (ver más adelante), contenía selenio. Ese mismo año, el grupo de T. Stadtman demostraba que la glicina reductasa de ciertos microorganismos era una selenoproteína [6]. La naturaleza química del selenio en estas enzimas demoraría en dilucidarse y depararía numerosas sorpresas.

El 21^{er} aminoácido: la selenocisteína

A diferencia de la mayoría de los elementos traza, que cumplen su función como cofactores enzimáticos, el Se en las selenoproteínas está presente bajo la forma de un aminoácido: la selenocisteína (Sec, en código de tres letras; U, en código de una letra); un análogo de la cisteína (Cys), que contiene Se en lugar de azufre (S) [7] (Figura 1). La selenocisteína tiene algunas diferencias con la cisteína, la más importante es su pKa: en tanto el pKa de Cys es 8.3, el de Sec es de 5.2, lo cual implica que a pH neutro el tiol de Cys está mayoritariamente en su forma neutra (protonada), en tanto el grupo selenol de Sec está cargado negativamente, como selenolato (ver Figura 1); además el átomo de Se tiene mayor polarizabilidad que el del S. Estas características confieren mayor nucleofilia al átomo de Se (con respecto al S) en un rango más amplio de pH, y por tanto una mayor reactividad. Las enzimas que contienen Sec en el sitio activo son, por norma, catalíticamente más eficientes que las homólogas que contienen Cys [8]. En cierta medida Sec puede considerarse una “súper cisteína” de reactividad extrema. De hecho, en las selenoproteínas de función conocida Sec está involucrada siempre en la función proteica, en reacciones redox [9,10]. Es interesante señalar en el paralelismo con Cys (el único otro aminoácido que participa en reacciones redox) que si bien Sec puede sustituir a Cys en catálisis redox, no sustituye a Cys en el plegamiento oxidativo, ni en la catálisis no redox (por ejemplo en las cisteín-proteasas).

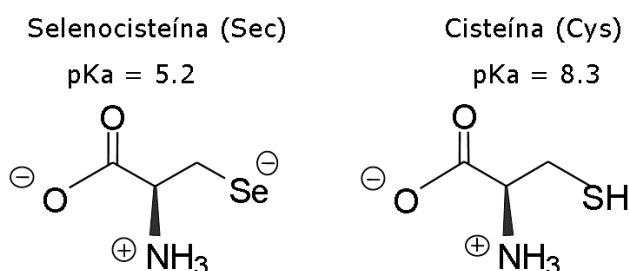


Figura 1. Fórmula de la selenocisteína (Sec) y de la cisteína (Cys). Debido a sus pKa a pH fisiológico la cadena lateral de la Sec está cargada negativamente, no así la de Cys. Dependiendo del contexto proteico el pKa del grupo selenol de Sec y del grupo tiol de Cys puede variar.

Al hallazgo de que el selenio estaba como Sec en ciertas enzimas siguieron otros más sorprendentes: Sec es incorporado a las cadenas polipeptídicas en crecimiento en el ribosoma, pero a diferencia de los 20 aminoácidos canónicos, Sec es codificada por un codón UGA (un codón que usualmente especifica la terminación de la síntesis de la cadena polipeptídica) [11], reprogramado para codificar Sec por un elemento de incorporación de Sec (elemento SECIS, del inglés *Sec Insertion Sequence*) presente, exclusivamente en los ARNm de las selenoproteínas (Figura 2). El elemento SECIS es el que desambigua el significado del codón UGA, y se localiza “secuencia abajo” del codón UGA: 10 nucleótidos hacia el extremo 3' del ARNm en bacterias, y en la región 3' no traducida en archaeas y eucariotas [12]. Aunque varían en secuencia todos poseen una estructura de “tallo-bucle” conservada. Estos hallazgos permitieron ampliar el código genético que se suponía que contenía solamente 20 palabras (ver Recuadro 1), e incorporar el concepto de la “codificación a distancia”. La dilucidación del mecanismo completo de incorporación de Sec fue liderada por el grupo de A. Böck en Alemania, en una serie de artículos clásicos que identificaron todos los genes que participan en la vía de incorporación de selenio en bacterias [13-16]. Además de la recodificación de un codón UGA por el elemento SECIS, otros aspectos novedosos surgieron de estas investigaciones del grupo alemán. A diferencia de los aminoacil-ARNt convencionales, que son reconocidos por un factor de elongación general, denominado EF-Tu, que media la incorporación de los aminoacil-ARNt al ribosoma, el selenocisteinil-ARNt^{Sec} es reconocido por un factor de elongación específico (denominado SelB o EF-Sec), el cual reconoce además de GTP y ARNt^{Sec}, al elemento SECIS del ARNm y media la incorporación del ARNt^{Sec} al ribosoma. En eucariotas el factor de elongación que une Sec-ARNt^{Sec} no interacciona directamente con el elemento SECIS, sino a través de la proteína de unión a SECIS, denominada SBP2 [17]; además, otras proteínas, como la proteína ribosomal L30, participan en el proceso de descodificación [18]. La Figura 2 resume el mecanismo de incorporación de Sec en bacterias y en eucariotas.

Otro aspecto novedoso de la síntesis de Sec es que ocurre exclusivamente sobre su ARNt (no existe la síntesis del aminoácido libre). El ARNt^{Sec} es previamente aminoacilado con serina, por una seril-ARNt sintetasa convencional (la misma enzima que cataliza la formación de seril-ARNt^{Ser}) dando lugar a seril-ARNt^{Sec}, el cual es luego modificado por la selenocisteína sintetasa a selenocisteinil-ARNt^{Sec} [19]. En eucariotas (y en archaeas), dos enzimas diferentes, en lugar de una, catalizan el pasaje de Ser-ARNt^{Sec} a Sec-ARNt^{Sec} [20], tal como se muestra en la Figura 3. En todos los casos el átomo de Se proviene del selenofosfato, el cual es sintetizado por la selenofosfato sintetasa (conocida como selD en bacterias o SPS2 en eucariotas) a partir de selenuro y ATP.

Sintéticamente podemos decir que la incorporación de Sec a la síntesis proteica requiere de algunos “ajustes” del aparato traduccional convencional. La similitud global del mecanismo de síntesis e incorporación de Sec en los tres dominios de lo viviente sugiere que la incorporación de la palabra Sec al código genético apareció una sola vez en la evolución, previo a la separación de los dominios. La existencia de linajes que no incorporan Sec indica que éstos perdieron esta capacidad ancestral, e indica que existen diferentes presiones selectivas que determinan el mantenimiento o la pérdida de la incorporación de Sec en lo viviente [21].

La secuenciación de genomas completos, junto al desarrollo de herramientas bioinformáticas para detectar selenoproteínas permitió determinar selenoproteomas completos, y descubrir nuevas familias de selenoproteínas. Estas estrategias informáticas se basaron en i) detectar la presencia de elemento SECIS “secuencia abajo” de un codón UGA en marco, y ii) analizando las secuencias posteriores a UGA; a esta última estrategia ayudó enormemente la observación de que la mayoría de los genes de selenoproteínas poseen homólogos en los cuales Sec es reemplazado por Cys [9]. Estos estudios revelaron que los organismos que incorporan Sec lo hacen en un número muy reducido de proteínas, y mostraron que los selenoproteomas de diferentes taxa varían tanto en el número como en el tipo de familias de selenoproteínas encontradas. A manera de ejemplo sólo una selenoproteína existe en el gusano *Caenorhabditis elegans* y 25 en el ser humano [22]. Desde un punto de vista evolutivo ha habido

evolución linaje específica de Cys a Sec (que requiere además de una sustitución la aparición de un elemento SECIS), pero también de Sec a Cys [23]. Las presiones selectivas subyacentes a la preferencia de Sec o Cys en determinadas taxa y en determinadas familias de proteínas no son totalmente claras; en este contexto es importante mencionar que si bien Sec aumenta la eficiencia de la catálisis redox, puede cambiar otras propiedades de las enzimas acarreado desventajas.

Finalmente, es importante reseñar que, además de la presencia de Se bajo forma de Sec, existen otras formas minoritarias de Se en lo viviente (ver Recuadro 2).

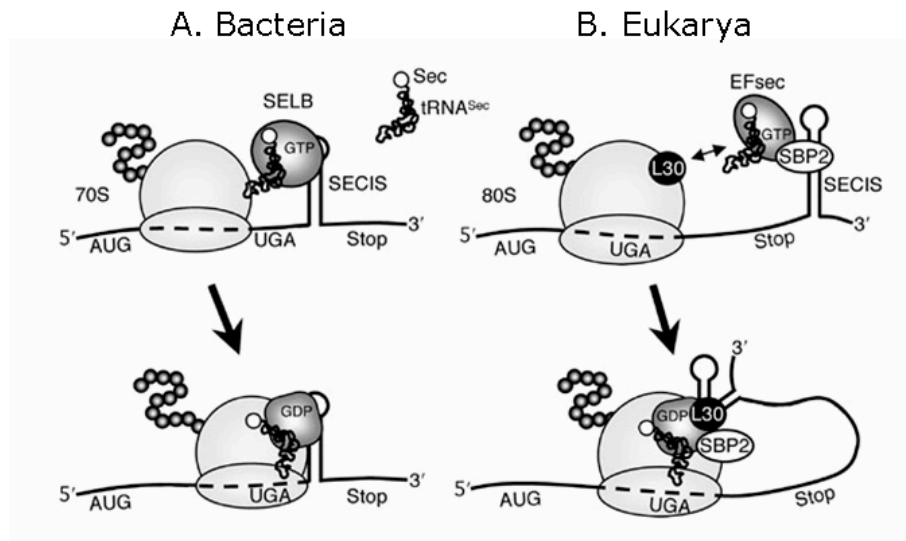


Figura 2. Incorporación de selenocisteína a la síntesis proteica. En bacterias SELB, el factor de elongación específico para Sec, une el elemento SECIS, GTP y ARNt^{Sec} formando un complejo cuaternario, la unión provoca de SELB al elemento SECIS un cambio conformational que media la transferencia del ARNt^{Sec} al sitio A del ribosoma, ocupado por un codón UGA. En eucariotas el elemento SECIS une a la proteína de unión a SECIS (SBP2), que recluta al factor de elongación de Sec (EFsec) y al ARNt^{Sec} ; luego de la asociación con el ribosoma, SBP2 es desplazada del elemento SECIS por la proteína ribosomal L30. El cambio conformational del elemento SECIS promueve la hidrólisis de GTP y la liberación del ARNt^{Sec} al sitio A del ribosoma. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [Nature Structural & Molecular Biology], [17], copyright (2005).

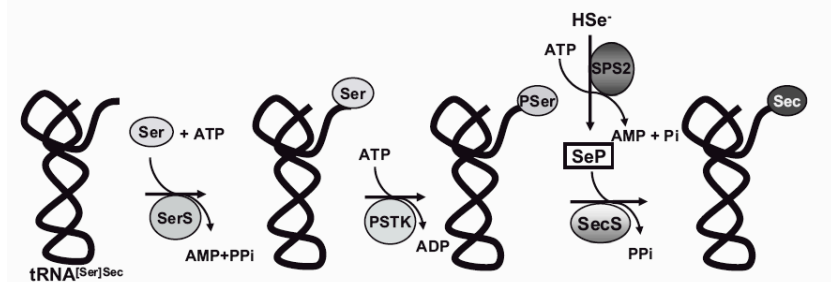


Figura 3. Biosíntesis de selenocisteína en eucariotas. El ARNt^{Sec} es aminoacilado por la seril-ARNt sintetasa (SerS), el residuo de serina es fosforilado por la O-fosfoseril-ARNt^{Sec} quinasa (PSTK) para dar lugar a O-fosfoseril-ARNt^{Sec}, que es convertido en selenocisteinil-ARNt^{Sec} por la selenocisteína sintetasa (SecS). SecS tiene también como sustrato al selenofosfato (SeP), cuya síntesis es catalizada por la selenofosfato sintetasa (SPS2) a partir de selenuro y ATP. Figura reproducida de [19].

Selenoproteínas humanas: su importancia en procesos fisiológicos y algunas generalizaciones sobre los mecanismos catalíticos de las selenoenzimas

Varias de las selenoproteínas presentes en humanos (y en mamíferos) son enzimas antioxidantes extremadamente eficientes, que forman parte de los sistemas de la tiorredoxina y del glutatión [22]. Estos sistemas mantienen la homeostasis redox de las células a expensas del poder reductor del NADPH, y participan en una variedad de procesos celulares [24]. Un esquema de cómo funcionan estos sistemas se presenta en la Figura 4a. En el sistema tiorredoxina, la selenoenzima tiorredoxina reductasa, una piridín-nucleótido tiol-disulfuro óxido-reductasa, oxida al NADPH y reduce a la forma oxidada de la tiorredoxina. La tiorredoxina reducida posee una multiplicidad de funciones, entre ellas provee electrones para enzimas esenciales (por ejemplo a la ribonucleótido reductasa), y enzimas antioxidantes, ejerce control redox de factores de transcripción y participa en el plegamiento de proteínas. Los mamíferos poseen tres formas de tiorredoxina reductasas, (citósólica, mitocondrial y específica de testículo), y las tres contienen un residuo de Sec redox activo, como parte del tetrapéptido GCUG (U denota Sec) carboxi-terminal. Así, en mamíferos todos los procesos dependientes del sistema tiorredoxina son selenio-dependientes. Los organismos *knock out* tanto en la tiorredoxina reductasa citosólica como en la tiorredoxina reductasa mitocondrial no son viables; la eliminación de estos genes da lugar a letalidad embrionaria. Uno de los blancos de la tiorredoxina es la enzima antioxidante metionina sulfóxido reductasa, que cataliza la reducción de metionina oxidada (libre y en proteínas) a metionina. Una de las formas de la metionina sulfóxido reductasa, que reduce específicamente el estereoisómero R, contiene Sec en su sitio activo. Otra enzima antioxidante, la glutatión peroxidasa (GPx), en tanto, es uno de los blancos del sistema glutatión. En humanos existen 8 GPx, de las cuales 5 contienen Sec en su sitio activo. De estas últimas, la GPx1 o citosólica fue la primer selenoproteína animal conocida. Es una enzima antioxidante extremadamente eficiente que cataliza la reducción de hidroperóxidos dependiente de glutatión (revisado en [2]). La GPx4, también conocida como fosfolípido hidroperóxido GPx, es la única GPx esencial en la embriogénesis en mamíferos; además de su función antioxidante de reducción de hidroperóxidos lipídicos, cumple un rol estructural esencial en la maduración de los espermatozoides [25]. Las funciones de las otras tres GPx que son selenoproteínas (GPx2 o gastrointestinal, GPx3 o plasmática y GPx6) no están totalmente dilucidadas, aunque se sabe que son importantes en situaciones de estrés oxidativo; en tanto las GPx que no contienen Sec no han sido estudiadas. La selenoproteína W es una selenoproteína antioxidante dependiente de glutatión, pero la función precisa que cumple esta selenoproteína se desconoce. Posee el motivo redox CXXU en un dominio tiorredoxina y se expresa predominantemente en músculo esquelético y corazón, en particular durante el desarrollo.

Recuadro 1: El código genético no es universal

Bastante antes de que el código genético fuera dilucidado, entre los investigadores que estudiaban el "problema del código" había ya consenso en que el número de aminoácidos incorporados durante la síntesis ribosomal de proteínas era 20. Más tarde, la dilucidación del código genético, que estableció una correspondencia entre codones o tripletes de nucleótidos y los 20 aminoácidos, fue recibida con beneplácito por la comunidad científica. La proclamación de que el código era "universal", es decir el mismo desde *Escherichia coli* hasta el ser humano constituía una constatación de la unidad histórica de lo viviente. Pero la naturaleza siempre sorprende: hoy sabemos que, en realidad, existen al menos 20 códigos diferentes, incluyendo nuestro propio código genético mitocondrial, que difiere de nuestro código nuclear. Luego del descubrimiento de la selenocisteína como aminoácido, se sumaría al diccionario de traducción la palabra 22: la pirrolisina [35], un aminoácido filogenéticamente restringido a unas pocas especies procariontas, codificado por un codón UAG. La variante más reciente del código genético fue descubierta en el organismo ciliado *Euplotes crassus*, en el cual UGA especifica la inserción de Cys y Sec, demostrando que el código genético puede utilizar un codón para codificar más de un aminoácido [36]. También a nivel del código se manifiesta la unidad y diversidad de lo viviente: todos los códigos que hoy conocemos son variantes sutiles de un código ancestral.

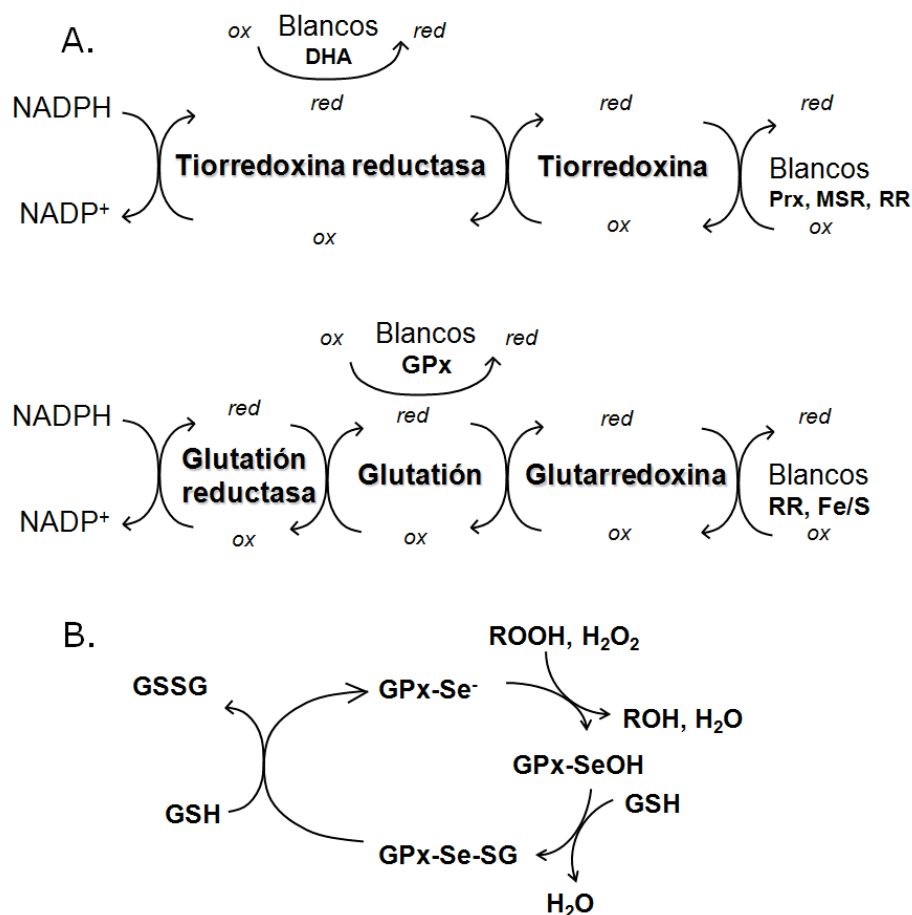


Figura 4. A. Flujo de electrones en los sistemas tiorredoxina y glutatión. En ambos sistemas, el NADPH es el dador inicial de equivalentes de reducción. En el sistema tiorredoxina (panel superior) los electrones son cedidos a la tiorredoxina reductasa, de ésta a la tiorredoxina. La tiorredoxina tiene numerosos blancos, entre ellos la peroxirredoxina (Prx, que reduce peróxido de hidrógeno), la metionina sulfóxido reductasa (MSR, que reduce metionina oxidada), la ribonucleótido reductasa (RR, que reduce ribonucleótidos), y es una proteína disulfuro reductasa general; la tiorredoxina reductasa también puede reducir blancos de bajo peso molecular, entre ellos el dehidroascorbato (DHA) y el ácido lipoico. En el sistema glutatión (panel inferior), los electrones del NADPH son cedidos a la glutatión reductasa, de ésta al glutatión, de éste a la glutaredoxina y de la glutaredoxina a diferentes blancos, entre ellos la RR. La glutaredoxina participa además en la biogénesis de centros Fe/S; en glutatión, en tanto, puede ceder electrones a otros blancos como la glutatión peroxidasa (GPx, que reduce peróxido de hidrógeno a agua e hidropéroxidos a alcoholes), funciona como un antioxidante general y además participa en reacciones de detoxificación mediadas por glutatión S-transferasas. Todas las reacciones esquematizadas involucran intercambios tiol(selenol)-disulfuro(selenil-sulfuro) reversibles. **B.** Esquema del mecanismo catalítico de las glutatión peroxidasas. La forma reducida de la GPx (esquematizada como GPx-Se⁻, en la que el selenol está como selenolato) reacciona con peróxido de hidrógeno o con hidropéroxidos orgánicos (ROOH), dando lugar a agua y alcoholes orgánicos (ROH), dando lugar a la forma oxidada por dos electrones de la GPx. La GPx oxidada es luego reducida en dos reacciones que involucran transferencia de un electrón, regenerando la forma reducida de la enzima. Como resultado neto de la reducción de peróxidos dos moléculas de glutatión reducido (GSH) dan lugar a glutatión oxidado (GSSG).

De forma análoga a lo que ocurre con las Cys redox activas durante el ciclo catalítico, donde su estado de redox cambia reversiblemente de tiol(ato) (estado de oxidación -2) a disulfuro (-1) o a sulfénico (0); en las tioredoxina reductasas, las glutatión peroxidadas y la metionina sulfóxido reductasa, los mecanismos catalíticos involucran al grupo selenol(ato) (estado de oxidación -2) de Sec que cambia reversiblemente a selenil-sulfuro (análogo al disulfuro, estado de oxidación -1) o selenénico (análogo al sulfénico, estado de oxidación 0). Un esquema de los intermediarios formados durante el ciclo catalítico de la glutatión peroxidasa se muestra en la Figura 4B. También es importante señalar que en las selenoproteínas con centros redox conteniendo Sec y Cys (por ejemplo motivos “redoxinas” como CXXU, UXXC y CU), como parte del ciclo catalítico, Sec ocupa siempre la posición homóloga a la Cys redox activa “atacante” o “nucleofílica”; no se ha encontrado Sec en la posición “resolutiva” del mecanismo.

Las yodotironinas de yodinasas constituyen otra familia de selenoproteínas; en humanos existen 3 de yodinasas, todas selenoenzimas. La tiroxina (conocida como T4 o tetrayodo tiroxina) es una pro-hormona de larga vida, que debe ser activada por de yodinasas a T3 (triyodo tiroxina), una hormona de vida media corta, que modula la expresión de genes en muchos tejidos, a través de la unión a factores de transcripción que promueven el metabolismo. En todos los vertebrados existen enzimas que activan T4 (a T3) y que inactivan T4 y T3. La de yodinasas de T4 a T3 ocurre en el anillo fenólico exterior de T4 y es catalizada por las de yodinasas 1 y 2 (Figura 5). Como contrapunto de la vía de activación, la activación de T4 puede ser prevenida por de yodinasas del anillo aromático interno, dando lugar a una forma inactiva de la hormona (rT3), y T3 puede ser irreversiblemente inactivada también por de yodinasas del anillo interno; estas reacciones son catalizadas por la de yodinasas 3 (y en menor medida por la de yodinasas 1) [26]; además las de yodinasas 1 y 2 pueden también actuar sobre rT3, sin consecuencias en la función hormonal (Figura 5). A su vez, la expresión y la actividad de las tres de yodinasas están sujetas a regulación. Estos mecanismos complejos (y no completamente entendidos) aseguran la homeostasis de la función tiroidea, en particular ante cambios ambientales como la ingesta variable de yodo. La de yodinasas 1 es particularmente importante para suministrar T3 al plasma y regular la cantidad de T4 en plasma, en tanto la de yodinasas 2 es requerida para mantener niveles importantes de T3 en el cerebro. Los ratones *knock out* en cualquiera de las de yodinasas de yodinasas son viables, pero dan diferentes tipos de trastornos: los *knock out* en las de yodinasas 1 y 2 dan problemas importantes de crecimiento y auditivos, entre otros; en tanto *knock out* en la de yodinasas 3 provocan toxicidad en la tiroides e hipotiroidismo. En línea con la importancia de estas selenoproteínas en el metabolismo de las hormonas tiroideas, se ha identificado que defectos genéticos en la proteína de unión a SECIS son causa de metabolismo anormal de las hormonas tiroideas.

En términos mecanísticos, las reacciones catalizadas por las de yodinasas son deshalogenaciones reductivas y el mecanismo que se propone involucra un intermediario Se-I oxidado; el sitio activo de las de yodinasas contiene el motivo FGSXTU dentro de un dominio con plegamiento Trx.

Otra selenoproteína de función conocida es la selenofosfato sintetasa (SPS2), que cataliza la síntesis de selenofosfato (un precursor de la síntesis de Sec) a partir de ATP y selenuro. La selenoproteína P, la única que codifica para múltiples residuos de Sec; posee 10 codones UGA en marco, aunque incorpora un número menor de residuos de Sec por cadena polipeptídica, ya que la incorporación de Sec no es un proceso 100% eficiente. La selenoproteína P es la más abundante en plasma y se supone que es importante en el transporte y la movilización de Se [27]. Los ratones *knock out* en la selenoproteína P muestran deficiencia de Se en muchos órganos; en particular en los testículos y en el cerebro y sufren de desórdenes neurológicos e infertilidad en los machos. Los espermatozoides carecen de vaina en la parte distal de la pieza media. La dieta con elevado Se restablece algunos de los síntomas de los desórdenes neurológicos. La selenoproteína N está implicada en la función muscular, pero su función precisa no es conocida. Existe un vínculo claro entre ciertas miopatías y la selenoproteína N; las mutaciones en la selenoproteína N llevan a distrofia muscular de espina

rígida y al fenotipo clásico de la miopatía con multiminicore. Finalmente, existen otras selenoproteínas de función desconocida, entre ellas, SelH, Sell, SelM, SelT, SelV y Sel15 o Sep15, todas ellas con presuntos motivos redox conteniendo Sec (CXXU o variantes de éste) dentro de un dominio Trx. En tanto SelK, SelO y SelS, también de función desconocida, son selenoproteínas con un residuo de Sec carboxi-terminal.

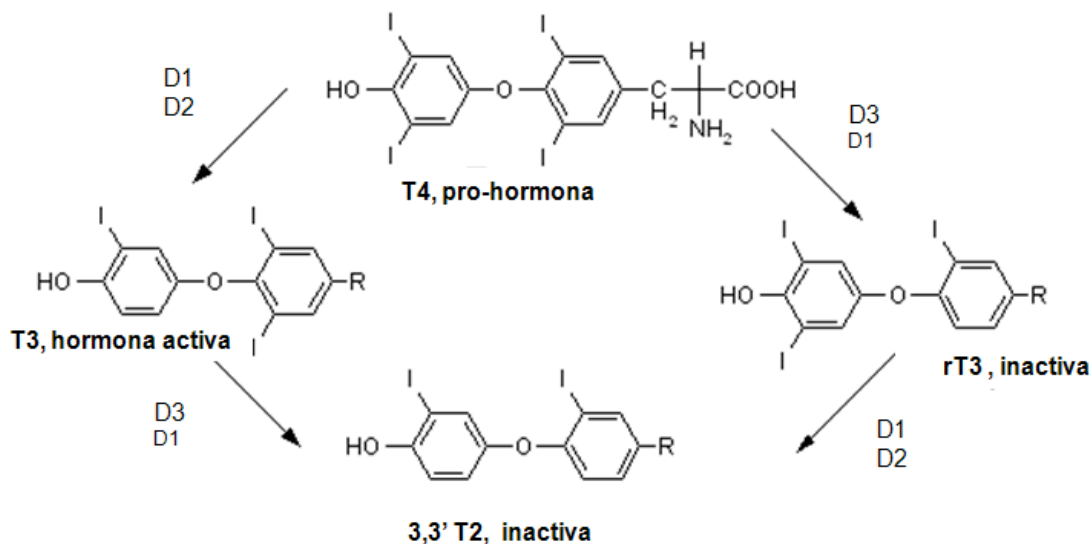


Figura 5. Mecanismos de activación e inactivación de las yodotironinas por las yodotironinas de yodinasas D1, D2 y D3. D1 y D2 son enzimas que participan, esencialmente, en la activación de T4 a T3, en tanto D3 participa en la inactivación de T3.

Si bien no se conoce la función de todas las selenoproteínas, en los últimos años se ha avanzado enormemente en dilucidar las funciones de muchas de ellas, y en los procesos fisiológicos en los que intervienen. A manera de resumen, podemos decir que hoy sabemos que las selenoproteínas son importantes en el mantenimiento de la homeostasis redox, el metabolismo hormonal tiroideo, la maduración de los espermatozoides, y la función muscular. Finalmente, de acuerdo a estudios recientes las selenoproteínas tienen también un papel importante en la inmunocompetencia de los vertebrados.

Una selenoproteína multifuncional en detalle: la tiorredoxina glutatión reductasa de platelmintos

Desde hace algunos años comenzamos a estudiar las defensas antioxidantes de un organismo parásito, el platelminto *Echinococcus granulosus*, causante de la hidatidosis. Los organismos parásitos que causan infecciones crónicas son excelentes modelos para el estudio de defensas antioxidantes, ya que están sometidos al estrés oxidativo del sistema inmune del hospedero. Algunas investigaciones tempranas, en particular la ausencia de catalasa (una enzima que dismuta peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno), nos dieron pistas de que las defensas antioxidantes en este organismo dependían de los sistemas tiorredoxina y glutatión. De manera sucinta podemos reseñar que nuestro trabajo y el de otros grupos de investigación que trabajan en bioquímica de platelmintos permitieron demostrar la existencia de un escenario bioquímico muy particular en platelmintos parásitos en relación a estas vías metabólicas [28-31]. A diferencia de sus hospederos vertebrados estos parásitos carecen de tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa convencionales y por tanto no poseen sistemas tiorredoxina y glutatión

canónicos; en cambio poseen la selenoenzima tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), que define un sistema tiorredoxina-glutatión "ligado" que provee de electrones a ambas rutas. La secuenciación de los genomas de los platelmintos parásitos confirmó la ausencia de los genes de tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa, y la existencia de un gen que codifica para TGR. La TGR posee varios centros redox y, a nivel de estructura primaria, proviene de la fusión de un dominio glutarredoxina a los dominios de una tiorredoxina reductasa, tal como se esquematiza en la Figura 6a. Para disecar como funciona esta enzima multifuncional, generamos un conjunto de proteínas recombinantes, incluyendo mutantes en los diferentes sitios redox activos; para las construcciones de selenoproteínas incluimos un elemento SECIS bacteriano que permitiera la decodificación del codón UGA^{Sec} en bacterias. En base a estos recombinantes determinamos que el residuo de Sec es esencial para las funciones tiorredoxina y glutatión reductasas, en tanto el dominio glutarredoxina es esencial para la actividad glutatión reductasa, pero no para la actividad tiorredoxina reductasa; la Figura 6b resume el flujo de electrones en la TGR para las diferentes actividades. Estos resultados indican que la homeostasis redox es dependiente de Sec, y sugieren la existencia de una bisagra flexible entre el dominio glutarredoxina y los dominios tiorredoxina reductasa, lo cual concuerda con la estructura tridimensional la TGR de *Schistosoma mansoni*, recientemente publicada [32]. Una peculiaridad de la actividad glutatión reductasa de la enzima es que exhibe un comportamiento histerético (un retraso en alcanzar la velocidad máxima) a alta concentración de glutatión oxidado [30]. Este comportamiento histerético de la enzima lo hemos asociado a la glutationilación de la enzima por glutatión oxidado, y la salida de la histéresis a la deglutationilación por glutatión reducido [33]. Recientemente hemos encontrado que la enzima posee actividad deglutationilante (de remoción de glutatión) frente a disulfuros mixtos péptidos-glutatión; como la actividad glutatión reductasa, la actividad deglutationilante es también dependiente de Sec y del dominio glutarredoxina, y es inhibida por cocientes altos de concentraciones de glutatión oxidado/glutatión reducido. Las actividades glutatión reductasa y deglutationilante de la TGR ocurren, a nivel del dominio glutarredoxina, a través de un mecanismo monotiólico.

Otros resultados que hemos obtenidos indican la existencia de variantes mitocondrial y citosólica de TGR en los platelmintos parásitos, producto del inicio alternativo de la transcripción del gen de la TGR. Esto sumado a la existencia de tiorredoxinas mitocondrial y citosólica (provenientes estas de diferentes genes), que aceptan electrones de la TGR indica la existencia de sistemas ligados tiorredoxina-glutatión, dependientes de Sec, en ambos compartimientos subcelulares [28,33].

Recuadro 2: Otras formas de selenio en la naturaleza

En los organismos vivos, además de estar presente como Sec, la forma más importante y más distribuida de selenio en las proteínas, el selenio ocurre en las proteínas bajo otras formas. En ciertas bacterias el selenio está presente en algunas molibdoenzimas (proteínas que contienen molibdeno), como la xantina deshidrogenasa y la ácido nicotínico hidroxilasa. Estas enzimas contienen selenio bajo la forma de un cofactor lábil, que contiene Se-Mo y está directamente involucrado en catálisis. Ni la naturaleza química exacta del Se en este cofactor ni su síntesis son conocidas. Por otra parte, el Se puede encontrarse en las proteínas bajo la forma de L-selenometionina; este aminoácido análogo a la metionina es incorporado a la síntesis proteica en lugar de metionina, con baja frecuencia y al azar (esto se debe a que las enzimas involucradas en la síntesis e incorporación de Met no discriminan entre el átomo de S y el de Se). Otra forma bajo la que se presenta el Se en la naturaleza es la 2-selenouridina, una base modificada análoga a la tiouridina, identificada, exclusivamente, en la posición de balanceo (wobble) de los anticodones de los ARNt^{Lys}, ARNt^{Glu} y ARNt^{Gln} de algunas bacterias; se piensa que esta modificación incrementa la fidelidad de la traducción de los codones terminados en purina. Finalmente, algunas plantas seleníferas acumulan diferentes compuestos de bajo peso molecular de Se como defensas químicas para evitar ser devoradas.

Las vías del glutatión y de la tioredoxina en conjunto son esenciales en una variedad de procesos fisiológicos. Como la TGR de platelmintos parásitos es la única enzima que provee electrones a ambas vías, su inhibición afectará la síntesis de ADN, la homeostasis redox global y otros procesos esenciales en estos organismos. Este escenario bioquímico único que contrasta con el de los hospederos de los parásitos ha llevado a estudiar a la TGR como blanco de drogas para estas parasitosis. De hecho, en estudios recientes se ha validado a la TGR como blanco de drogas para platelmintos [34], y se han identificado estructuras de amidas fosfínicas, oxadiazoles. Actualmente, algunos de nuestros estudios están centrados en la búsqueda de inhibidores de quimiotecas discretas de moléculas electrofílicas, explotando la reactividad del selenolato de Sec, un nucleófilo extremadamente reactivo.

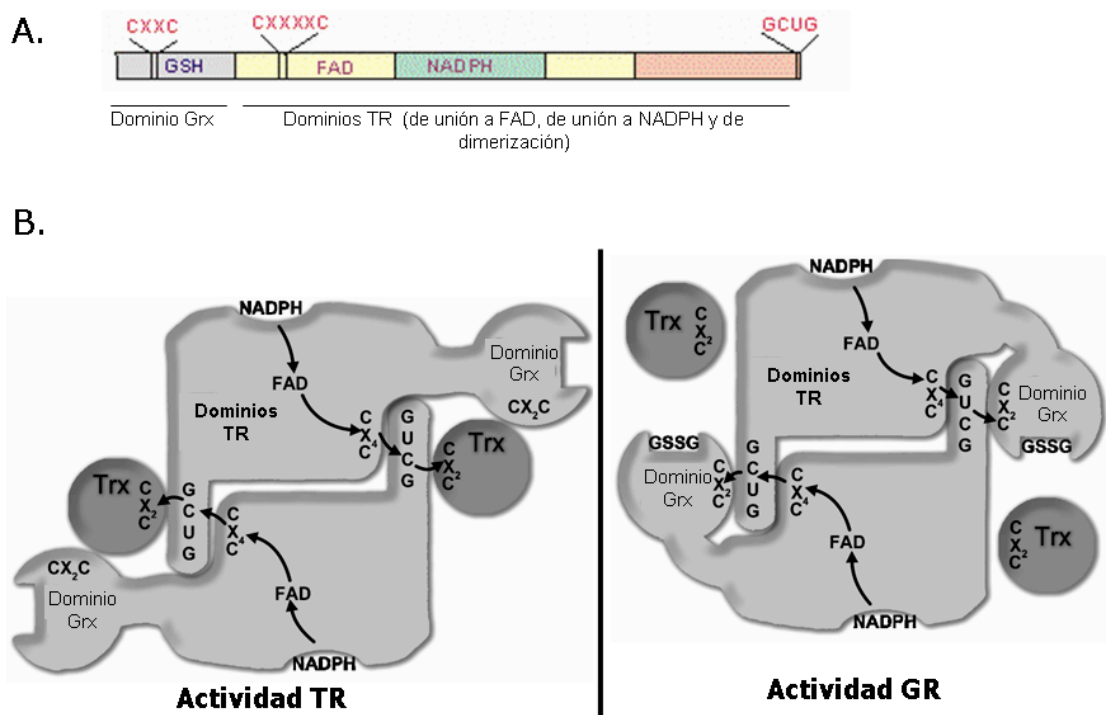


Figura 6. A. Estructura primaria de la tioredoxina glutatión reductasa (TGR). En gris se indica el dominio glutarredoxina N-terminal, en amarillo el dominio discontinuo de unión a FAD, en verde el dominio de unión a NADPH y en rosado el dominio de dimerización. Se indican los centros redox, así como el grupo prostético FAD, y los ligandos glutatión (GSH) y NADPH. **B.** Modelo de la secuencia del flujo de electrones a través del sistema ligado glutatión-tiorredoxina para la actividad tioredoxina reductasa (TR, a la izquierda) y para la actividad glutatión reductasa (GR, a la derecha), de acuerdo a los resultados obtenidos con la TGR y un conjunto de mutantes de la TGR (en el centro redox amino-terminal, CX_2C , en centro redox carboxi-terminal (GCUG) y un mutante sin dominio glutarredoxina, Grx). Como se muestra, el dominio Grx de la TGR sería el responsable de la reducción del GSSG (actividad GR). Esto implica un paso en dirección contraria al que ocurre en el sistema del GSH, el cual es posible debido a la proximidad de los potenciales redox estándar del GSH y de la Grx. Para ambas actividades se requiere el centro redox que contiene selenocisteína.

Referencias

1. Oldfield, J. E. (2006) *Selenium: Its molecular biology and role in human health*. Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N., and Berry, M. J (eds), 2nd Ed., Springer
2. Flohe, L. (2009) *Biochim Biophys Acta* **1790**(11), 1389-1403
3. Schwarz, K., and Foltz, C. M. (1957) *J Am Chem Soc* **79**, 3292-3293
4. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., and Hoekstra, W. G. (1973) *Science* **179**(73), 588-590
5. Flohe, L., Gunzler, W. A., and Schock, H. H. (1973) *FEBS Lett* **32**(1), 132-134
6. Turner, D. C., and Stadtman, T. C. (1973) *Arch Biochem Biophys* **154**(1), 366-381
7. Cone, J. E., Del Rio, R. M., Davis, J. N., and Stadtman, T. C. (1976) *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(8), 2659-2663
8. Stadtman, T. C. (1996) *Annu Rev Biochem* **65**, 83-100
9. Gladyshev, V. N. (2006) *Selenium: Its molecular biology and role in human health*. Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N., and Berry, M. J (eds), 2nd Ed., Springer
10. Lu, J., and Holmgren, A. (2009) *J Biol Chem* **284**(2), 723-727
11. Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., and Harrison, P. R. (1986) *Embo J* **5**(6), 1221-1227
12. Zinoni, F., Heider, J., and Bock, A. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12), 4660-4664
13. Bock, A., and Stadtman, T. C. (1988) *Biofactors* **1**(3), 245-250
14. Leinfelder, W., Forchhammer, K., Zinoni, F., Sawers, G., Mandrand-Berthelot, M. A., and Bock, A. (1988) *J Bacteriol* **170**(2), 540-546
15. Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M. A., and Bock, A. (1988) *Nature* **331**(6158), 723-725
16. Forchhammer, K., Leinfelder, W., and Bock, A. (1989) *Nature* **342**(6248), 453-456
17. Caban, K., and Copeland, P. R. (2006) *Cell Mol Life Sci* **63**(1), 73-81
18. Chavatte, L., Brown, B. A., and Driscoll, D. M. (2005) *Nat Struct Mol Biol* **12**(5), 408-416
19. Leinfelder, W., Forchhammer, K., Veprek, B., Zehelein, E., and Bock, A. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(2), 543-547
20. Xu, X. M., Carlson, B. A., Mix, H., Zhang, Y., Saira, K., Glass, R. S., Berry, M. J., Gladyshev, V. N., and Hatfield, D. L. (2007) *PLoS Biol* **5**(1), e4
21. Romero, H., Zhang, Y., Gladyshev, V. N., and Salinas, G. (2005) *Genome Biol* **6**(8), R66
22. Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., and Gladyshev, V. N. (2003) *Science* **300**(5624), 1439-1443
23. Zhang, Y., Romero, H., Salinas, G., and Gladyshev, V. N. (2006) *Genome Biol* **7**(10), R94
24. Toledano, M. B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D., and Tacnet, F. (2007) *FEBS Lett* **581**(19), 3598-3607
25. Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., and Flohe, L. (1999) *Science* **285**(5432), 1393-1396
26. Bianco, A. C., and Larse, P. R. (2006) *Selenium: Its molecular biology and role in human health*. Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N., and Berry, M. J (eds), 2nd Ed., Springer
27. Hoffmann, P. R., Hoge, S. C., Li, P. A., Hoffmann, F. W., Hashimoto, A. C., and Berry, M. J. (2007) *Nucleic Acids Res* **35**(12), 3963-3973
28. Agorio, A., Chalar, C., Cardozo, S., and Salinas, G. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* **278**(15), 12920-12928
29. Alger, H. M., and Williams, D. L. (2002) *Mol Biochem Parasitol* **121**(1), 129-139
30. Rendón, J. L., del Arenal, I. P., Guevara-Flores, A., Uribe, A., Plancarte, A., and Mendoza-Hernández, G. (2004) *Molecular and Biochemical Parasitology* (133), 61-69
31. Salinas, G., Selkirk, M. E., Chalar, C., Maizels, R. M., and Fernández, C. (2004) *Trends in Parasitology* **20**(7), 340-346
32. Angelucci, F., Miele, A. E., Boumis, G., Dimastrogiovanni, D., Brunori, M., and Bellelli, A. (2008) *Proteins* **72**(3), 936-945
33. Bonilla, M., Denicola, A., Novoselov, S. V., Turanov, A. A., Protasio, A., Izmendi, D., Gladyshev, V. N., and Salinas, G. (2008) *J Biol Chem* **283**(26), 17898-17907

34. Kuntz, A. N., Davioud-Charvet, E., Sayed, A. A., Califf, L. L., Dessolin, J., Arner, E. S., and Williams, D. L. (2007) *PLoS Med* **4**(6), e206
35. Hao, B., Gong, W., Ferguson, T. K., James, C. M., Krzycki, J. A., and Chan, M. K. (2002) *Science* **296**(5572), 1462-1466
36. Turanov, A. A., Lobanov, A. V., Fomenko, D. E., Morrison, H. G., Sogin, M. L., Klobutcher, L. A., Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N. (2009) *Science* **323**(5911), 259-261

Semblanza del Dr. Gustavo Salinas



El Dr. Gustavo Salinas es Químico Farmacéutico egresado de la Universidad de la República, Uruguay. Realizó sus estudios doctorales y post-doctorales en el Departamento de Patología de la Universidad de Cambridge, Inglaterra, en Biología Molecular de Parásitos. Desde su regreso a Uruguay, en 1996, sus investigaciones han girado, fundamentalmente, en torno a la caracterización de las defensas antioxidantes de platelmintos parásitos. Su trabajo ha contribuido a demostrar la

existencia, en estos organismos, de un escenario bioquímico diferente al de los hospederos, con ausencia de sistemas tiorredoxina y glutatión independientes, y presencia de vías ligadas por la selenoenzima tiorredoxina glutatión reductasa. Sus investigaciones han caracterizado a nivel cinético y molecular esta enzima que juega un papel esencial en el control de la homeostasis redox global en estos organismos y constituye un blanco promisorio para el control de las infecciones por platelmintos. Sus investigaciones también han contribuido al estudio de la evolución de la incorporación del aminoácido selenocisteína en la síntesis proteica, demostrando que el código genético puede ser expandido por transferencia horizontal de los genes que participan en la incorporación de este aminoácido. Es investigador de nivel II del Sistema Nacional de Investigadores de Uruguay, y del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas. Ha dirigido y dirige tesis de grado y posgrado y ha publicado en prestigiosas revistas internacionales tales como *The Journal of Biological Chemistry*, *Genome Biology and Nucleic Acids Research*. Es Profesor Agregado en régimen de dedicación Total de la Universidad de la República. En el plano docente, imparte clases y es corresponsable de los cursos de grado de Introducción a las Ciencias Biológicas de la Facultad de Química y de postgrado de Bioquímica Redox de Tioles.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 135-141. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

INGENIERÍA DE PROTEÍNAS Y EVOLUCIÓN DIRIGIDA

Lorenzo Segovia¹ y Mariana Peimbert²

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM

²Departamento de Ciencias Naturales, UAM-C

lorenzo@ibt.unam.mx

Resumen

La ingeniería de proteínas depende de información a priori, tanto a nivel estructural como evolutivo. Sin estos parámetros es imposible diseñar cambios que permitan entender la relación estructura función de una proteína. Para obviar esta limitación ha surgido una nueva técnica, llamada evolución dirigida, la cual permite obtener un gran número de variantes las cuales son subsecuentemente evaluadas ya sea por selección in vivo o por tamizaje in vitro. Esta técnica imita a la evolución molecular ya que genera una gran cantidad de proteínas modificadas con variabilidad genética enorme, las cuales son sometidas a selección a través de ciclos sucesivos de mutación donde la propiedad que se busca es seleccionada hasta encontrar una proteína con una mejor función en un periodo de tiempo relativamente corto.

Palabras clave: Ingeniería de proteínas, evolución molecular, evolución dirigida, PCR mutagénico.

Abstract

Protein engineering is dependent on the previous knowledge of both protein structure and evolutionary history. Without these it is impossible to design changes that allow us to understand structure and function relationships in proteins. To obviate this need a new technique has been proposed, called directed evolution, that allows for the generation of genetic variability which is latter selected for desired traits either in vivo or through in vitro screening procedures. This technique imitates molecular evolution in the sense that it generates a great amount of genetic variability, which is submitted to selection, also several incremental mutation and selection cycles can be performed with concomitant increases in the desired property in a short time span.

Keywords: Protein engineering, molecular evolution, directed evolution, error-prone PCR.

Evolución molecular

La variabilidad genética es el motor de la evolución. La selección natural determina el número de sobrevivientes de una población al seleccionar aquellas propiedades que les confieren una mayor capacidad de adaptación. A nivel molecular, han surgido una enorme cantidad de genes homólogos (*i.e.* que tiene un ancestro común) a través del proceso de generación de variabilidad, los cuales codifican para proteínas adaptadas a los medios más diversos y condiciones por demás extremas manteniendo la misma actividad catalítica. A través de duplicaciones génicas dentro de un mismo genoma, han surgido genes nuevos los cuales han acumulado mutaciones al grado de codificar proteínas estables con actividades distintas. Se piensa que este último fenómeno ha sido clave en la aparición de las numerosas actividades catalíticas existentes [1,2]. Existen varios mecanismos genéticos adicionales que permiten la aparición de nuevas formas de proteínas. En particular, la recombinación génica produce nuevas variantes que poseen propiedades provenientes de ambos donadores o incluso propiedades totalmente nuevas.

Estructura tridimensional de proteínas

En los últimos 40 años se empezó a caracterizar la estructura tridimensional de las proteínas, es decir, la descripción de la posición en el espacio de cada uno de los átomos que componen a una proteína. Esta labor tan compleja es el fruto del desarrollo y adaptación de técnicas, especialmente de cristalografía de rayos X, durante varias décadas. 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 incluso días, pero sigue constituyendo un logro extraordinario dentro de la genómica estructural. En los últimos años se ha logrado, asimismo, incorporar la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) al arsenal de herramientas para la determinación de estructuras proteicas. Como producto de estos esfuerzos, ahora conocemos varios miles de estructuras tridimensionales independientes, con las que podemos realizar estudios comparativos y derivar nociones generales sobre la arquitectura de las moléculas y de su funcionamiento a un nivel atómico [3]. De esta manera, estas estructuras permiten entender cuál es la participación de cada uno de los aminoácidos en la catálisis de una enzima [4].

Ingeniería de proteínas

La evolución molecular y la estructura tridimensional de las moléculas son conocimientos necesarios para realizar un trabajo de ingeniería de proteínas. Por una parte tenemos la información de la variabilidad de cada residuo y por el otro la posición tridimensional y la interacción con otros residuos en el espacio [1,4]. El ingeniero de proteínas diseña mutaciones en los sitios donde cree que pueden tener un efecto sobre una función (la actividad catalítica) y utiliza la información evolutiva para seleccionar el tipo de cambio que desea. Esto es un diálogo que se establece interrogando la relación que guardan secuencia, estructura y función. La ingeniería de proteínas depende del conocimiento *a priori* de una gran cantidad de información estructural y evolutiva que no siempre está disponible. Además todavía no podemos hacer predicciones razonablemente precisas sobre los efectos que tendrán mutaciones específicas en las proteínas a nivel teórico. Una manera de poder lidiar con estas limitaciones ha sido introduciendo mayor diversidad (mutaciones) en una o más posiciones, y utilizar técnicas más simples para determinar rápidamente cuáles mutaciones generan proteínas con características útiles o interesantes.

Así, en los últimos veinte años, se ha avanzado en lo que podemos definir esquemáticamente como los dos enfoques para el estudio de proteínas con DNA recombinante: la ingeniería de proteínas, y la evolución experimental o evolución dirigida. Todo ello, naturalmente, acompañado de estudios teóricos que ayudan a enmarcar la naturaleza y la dimensión del fenómeno. Hoy en día, como se mencionó anteriormente, se conocen sólo algunos miles de estructuras de proteínas cuando se tiene registradas millones de secuencias distintas de proteínas. Aunque existen técnicas cada vez más poderosas que permiten suponer cuál es la estructura tridimensional correcta a partir sólo de la secuencia de aminoácidos, existen un sin fin de secuencias proteicas de las cuales no se tiene una idea clara de cuál pueda ser su estructura, ya sea por limitaciones experimentales o por falta de capacidad y de tiempo para determinarlas.

Evolución dirigida

Una de las lecciones de la Evolución es que la solución está en los números y en el azar. Utilizando técnicas de generación de variantes al azar, como por ejemplo con reacciones de PCR donde se induce la aparición de mutaciones al cambiar las condiciones de reacción, se pueden obtener librerías de variantes las cuales pueden ser tamizadas o retadas para la aparición de la propiedad deseada (figura 1) [5,7].

Este principio de introducción de variabilidad acoplado a selección es, conceptualmente, bastante sencillo. Desde el punto de vista práctico, sin embargo, existen limitaciones que han evitado que se despliegue de manera significativa su tremendo potencial. Estas limitaciones se presentan tanto en la generación de diversidad, como en los métodos de búsqueda y selección. Hoy en día se han generado tanto técnicas que producen mutaciones puntuales como técnicas que generan recombinaciones entre diferentes genes parentales o que presentan ambas características [5-7]. Asimismo se han propuesto protocolos para la generación de variabilidad al azar pero sólo en ciertas posiciones determinadas de antemano, de manera que se obtenga un mayor número de mutantes potencialmente interesantes [8].

Este enfoque, pese a sólo ser una caricatura de la evolución natural, permite además hacer evolución experimental en el laboratorio que nos permite analizar los porqués y cómo de la historia natural de una familia de proteínas [9,10].

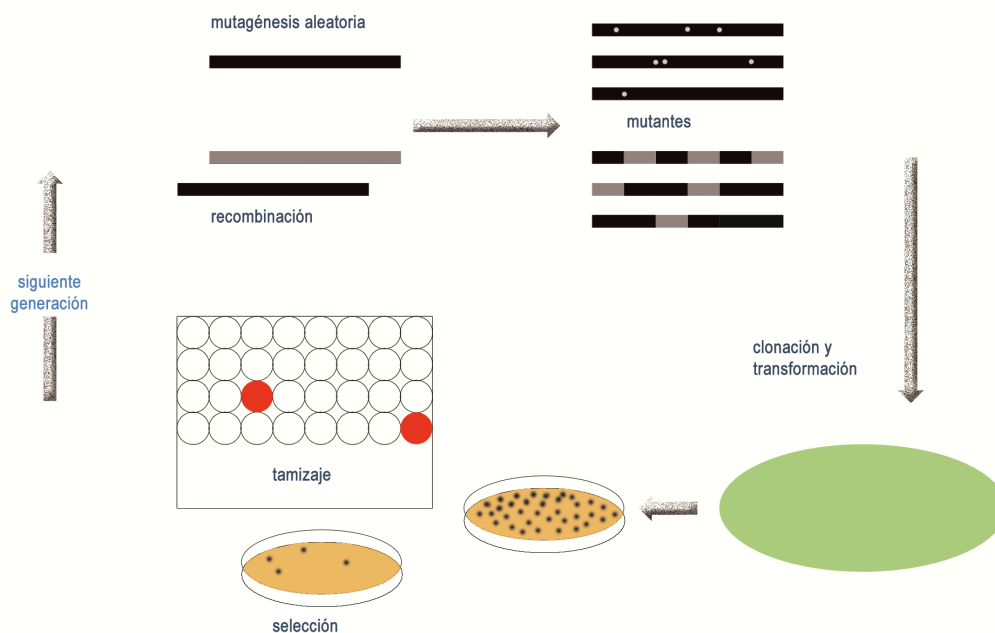


Figura 1. Esquema de la evolución dirigida. Una secuencia puede ser sometida a amplificación por PCR mutagénico o recombinativo. Los productos de estas reacciones son clonados en vectores de expresión y transformados en una cepa bacteriana apropiada, ya sea para selección o expresión. Las clonas son seleccionadas *in vivo* o por tamizaje *in vitro*. Las clonas ganadoras son sometidas a ciclos sucesivos de evolución dirigida hasta obtener el incremento deseado en la función buscada [5,6].

Evolución molecular experimental

La teoría de Evolución es precisamente eso, una teoría. Es una explicación *a posteriori*, ya que sólo es un edificio conceptual que pretende explicar las observaciones hechas en la naturaleza. Las numerosas inferencias producidas por los análisis evolutivos deben ser puestas a prueba con un enfoque experimental que permita evaluar si son correctas. En ese sentido, se han generado dos grandes líneas de investigación, una basada en la reconstrucción filogenética de la historia evolutiva de algún gen particular, y la otra en la realización de experimentos tendientes a reproducir algún paso evolutivo. Cabe resaltar que las principales limitaciones de cualquier enfoque evolutivo experimental son primero el tiempo, ya que la evolución natural transcurre a través de millones o miles de millones de años; y segundo, el tamaño de las poblaciones, las cuales son en la naturaleza de órdenes de magnitud mayores.

Las secuencias ancestrales

Uno de los mitos de la evolución actual ha sido que las enzimas ancestrales deben de ser poco eficientes, ya que suponemos que eran menos específicas catalíticamente. Sin embargo, esta idea es producto de una serie de prejuicios en que imaginamos a las enzimas ancestrales como a un troglodita molecular que arrastra sus nudillos. Para poner a prueba esta idea, el grupo del Dr. Benner de la Universidad de Florida determinó la secuencia más probable

del ancestro de las ribonucleasas del rumen de la vaca y construyó un gen sintético que la codificaba. Cada una de las formas actuales tiene especificidades distintas para RNA de cadena doble o sencilla y actividades óptimas a diferentes pH [11]. Una de las hipótesis del Dr. Benner era que el producto del gen ancestral tendría una procesividad igual de mala en cualquier condición. Sin embargo, la rebonucleasa ancestral mostró ser extremadamente activa contra ambos sustratos y en las condiciones de pH más diversas. Contrariamente a lo que se pensaba, este grupo demostró que la evolución no producía enzimas más eficientes y adaptadas a distintos medios a partir de un ancestro general y poco procesivo, sino que genera formas especializadas a partir de un ancestro general, pero que son extremadamente eficientes al perder las características de amplio espectro [11].

Una derivación interesante de este tipo de trabajo ha sido el estudio de las propiedades de una secuencia consenso en una familia de proteínas [9,12]. En este contexto, *consenso* se entiende como una secuencia de aminoácidos que en cada posición tiene el residuo más común en un alineamiento múltiple. Se ha mostrado en la literatura reciente que estas proteínas consenso tienen propiedades extremadamente interesantes, como son una mayor estabilidad y, en algunos casos, mayor amplitud en el espectro de sustratos que pueden utilizar [9,12]. Ésta es un área en plena expansión que permite explicar por qué mutaciones aparentemente deletéreas, ya que disminuyen la estabilidad de una proteína, son seleccionadas y mantenidas en la población.

Aplicación de la evolución molecular

Una de las ventajas de la evolución dirigida es que en principio no se necesita ninguna información *a priori* de la molécula. Sólo basta tener el gen con el que se piensa iniciar el proceso y no es necesario tener información de su estructura. En particular, una propiedad como la estabilidad no está determinada por cambios fácilmente predecibles, sino que es difusa a través de la estructura y, por lo tanto, no se requiere conocerla. No obstante, como se detallará más adelante, a veces será conveniente limitar la generación de mutaciones en algunos residuos particulares, los cuales podrían estar involucrados en la propiedad que se busca cambiar, como cuando está claramente localizada en el sitio activo de una enzima [8]. En este caso, se deberá contar con la mayor información posible. El primer paso es conocer la secuencia del mayor número de ortólogos (genes homólogos que cumplen el mismo papel en especies distintas) posible para determinar la variabilidad de distintas zonas de las secuencias. Este tipo de información nos permite identificar las zonas de menor variabilidad, las cuales están frecuentemente asociadas al sitio activo o a zonas regulatorias. La manera más fácil es buscar en bancos de secuencias utilizando técnicas bioinformáticas. Posteriormente, se construyen alineamientos múltiples que muestran las zonas equivalentes en cada secuencia. Este enfoque permite, en algunos casos, identificar secuencias homólogas de estructura tridimensional conocida. Se pueden construir modelos relativamente precisos de la estructura tridimensional de la enzima problema utilizando como molde una estructura homóloga. Esta información, a su vez, permite dirigir la mutagénesis con mayor precisión y, por ende, eficiencia. En algunos casos donde no existen homólogos de estructura conocida, también se puede identificar la estructura de una proteína utilizando técnicas de hilvanado (*threading* en Inglés) para construir modelos estructurales [13,14].

Generación de diversidad

Una proteína de *E. coli* tiene en promedio 319 aminoácidos. Existen 6,061 variantes de mutaciones sencillas, 18 millones de variantes dobles, 36 mil millones de variantes con tres cambios, y 19^{319} variantes con cambios en todas las posiciones. Este último número es mayor al número de partículas atómicas en el universo. Como se puede ver, sólo es posible analizar un número extremadamente restringido de variantes en un experimento. Los mejores bancos de

variantes que se pueden obtener habitualmente en un laboratorio tienen cerca de 10^8 variantes, lo cual indica que sólo se podrían analizar todas las variantes con tres o menos cambios por experimento [5]. Por otra parte, la comparación de secuencias indica que existen numerosos casos de enzimas homólogas que tienen sólo 25% de identidad y sin embargo sus actividades catalíticas son indistinguibles. En este sentido, la exploración de variantes en el laboratorio podría ser extremadamente limitada en comparación con la realizada por la evolución natural.

Además, se ha observado que con las técnicas de mutagénesis puntuales empleadas sólo se pueden obtener un promedio de cinco residuos distintos por posición. Para tratar de remediar estas carencias se han seguido distintos enfoques más o menos exitosos. Por ejemplo, se ha concentrado la mutagénesis a las zonas que en las que se piensa que deben estar los residuos determinantes para obtener el resultado deseado. Se han generado estrategias de combinación de bancos de variantes concentrados en distintas zonas de la proteína [8,15]. Sin embargo, las técnicas basadas en la generación de mutaciones puntuales tienen limitaciones importantes, por lo que se hace necesario desarrollar nuevas técnicas.

Métodos de selección y búsqueda

Los mejores métodos de obtención son aquellos que se basan en la selección directa de las variantes deseadas, ya sea por complementación de mutantes carentes de esta actividad o por conferir resistencia a algún antibiótico, entre otras. Sin embargo, estos casos son los menos, ya que algunas de las actividades o propiedades deseadas no pueden ser seleccionadas *in vivo* [16]. Por ejemplo, es prácticamente imposible si se busca una actividad enzimática que funcione a más de 100°C y a un pH de 1, ya que son condiciones que muy rara vez se encuentran en la naturaleza. En estos casos es necesario ensayar individualmente las propiedades bioquímicas de cada una de las variantes, para lo cual se usa sistemas de tamizaje de alta densidad robotizados (*High Throughput Screening*). En los mejores casos, estos sistemas pueden analizar unas pocas decenas de miles de clonas, cuando en un sistema de selección directa se pueden analizar millones de clonas. Existen también casos en los que las actividades deben ser medidas con sistemas de cromatografía de gases o de HPLC, que limitan aún más el número de clonas analizables [17]. Para tratar de evadir estas limitaciones, algunos grupos han utilizado sistemas donde miden la catálisis de algún análogo. Desafortunadamente, han observado que con frecuencia obtienen enzimas que han sido seleccionadas para mejorar sólo en las propiedades necesarias con el análogo, no con el sustrato de interés, por lo que es un enfoque que hay que utilizar con mucha cautela [17].

Referencias

1. Anantharaman, V., Aravind, L., and Koonin, E.V. (2003) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 12-20
2. Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., Sterner, R., and Wilmanns, M. (2000) *Science* **289**, 1546-1550
3. Hennig, M., Sterner, R., Kirschner, K. and Jansonius, J.N. (1997) *Biochemistry* **36**, 6009-6016
4. Tuchscherer, G., Scheibler, L., Dumy, P. and Mutter, M. (1998) *Biopolymers* **47**, 63-73
5. Stemmer, W.P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10747-10751
6. Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A. and Arnold, F.H. (1998) *Nat. Biotechnol.* **16**, 258-261
7. Stemmer, W.P. (1994) *Nature* **370**, 389-391
8. Peimbert, M. and Segovia, L. (2003) *Protein Eng.* **16**, 27-35.
9. Joerger, A.C., Mayer, S. and Fersht, A.R. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5694-5699
10. Jurgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M. and Sterner, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9925-9930

11. Stewart, C.B. (1995) *Nature* **374**, 12-13
12. Lehmann, M., Kostrewa, D., Wyss, M., Brugger, R., D'Arcy, A., Pasamontes, L., and van Loon A.P. (2000) *Protein Eng.* **13**, 49-57
13. Bennett-Lovsey, R.M., Herbert, A.D., Sternberg, M.J. and Kelley, L.A. (2008) *Proteins* **70**, 611-625
14. Kelley, L.A. and Sternberg, M.J. (2009) *Nat. Protoc.* **4**, 363-371
15. Saab-Rincon, G., Juárez, V.R., Osuna, J., Sánchez, F. and Soberón, X. (2001) *Protein Eng.* **14**, 149-155
16. Umbarila, L.R. (2000) *Desarrollo de un sistema de selección para la actividad de aldolasa*. Tesis Facultad de Química, UNAM. Cuernavaca.
17. Moore, J.C. and Arnold, F.H. (1996) *Nat. Biotechnol.* **14**, 458-467

Semblanza del Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella



Cursó la Licenciatura, la Maestría y el Doctorado en Investigación Biomédica Básica en la UNAM. Obtuvo el grado de Doctor en 1990 con Mención Honorífica y fue contratado como Investigador Asociado en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM. Posteriormente realizó de 1992 a 1994 un entrenamiento posdoctoral en el laboratorio de Estructura y Función de Proteínas del Instituto Nacional del Ojo (NEI) de los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU (NIH) con una beca Fogarty. Se reincorporó en 1994 al Instituto de Biotecnología de la UNAM en la categoría de Investigador Asociado. Desde

2006 es Investigador Titular B del departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Tiene el nivel de PRIDE D y es miembro del SNI con la categoría II. El grupo del Dr. Segovia trabaja en el estudio de la evolución y manipulación de la relación estructura-función de enzimas utilizando tanto un enfoque experimental como bioinformático. Entre sus aportaciones destaca una de las primeras migraciones catalíticas donde su grupo logró reproducir experimentalmente la aparición evolutiva de una actividad enzimática. Asimismo ha trabajado sobre la evolución del metabolismo utilizando herramientas bioinformáticas novedosas basadas en la teoría de redes. El Dr. Segovia es autor de 28 trabajos de investigación originales los cuales han sido citados más de 1400 veces. Asimismo ha publicado dos artículos de divulgación en revistas de muy alto impacto. Ha publicado 14 capítulos en libros tanto de divulgación como de investigación. Ha sido invitado a presentar en numerosos congresos internacionales y ha participado como organizador en cuatro Congresos Internacionales. Prestó además dos asesorías técnicas a la compañía Diversa Inc. , San Diego, EEUU en 2001 y 2003. El Dr. Segovia es miembro de la Protein Society de los EEUU y de la Academia de Ciencias de Morelos. Es Consejero Investigador por el Instituto de Biotecnología ante el Consejo Universitario y el Consejo Técnico de la Investigación Científica de la UNAM.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 143-154. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

LOS FLAVONOIDES: MECANISMO DE ACCIÓN, NEUROPROTECCIÓN Y EFECTOS FARMACOLÓGICOS

Daniel Limón¹, Alfonso Díaz¹, Liliana Mendieta¹, Félix Luna¹, Edgar Zenteno² y Jorge Guevara²

¹ Lab. de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas BUAP

² Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

ilhlimon@yahoo.com.mx

Resumen

Los flavonoides son compuestos presentes en frutas, vegetales, y bebidas derivadas de plantas, por ejemplo: el vino, té, cacao, cerveza y jugo de frutas. El creciente interés en los flavonoides se debe a su amplia actividad farmacológica. Se han descrito efectos protectores en diversas condiciones patológicas como la isquemia cardiovascular, diabetes mellitus, hipercolesteremia, la aterosclerosis y el cáncer. Recientemente, sus efectos benéficos se han asociado como una alternativa en el tratamiento de las enfermedades Neurodegenerativas, como en la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP).

El potencial neuroprotector de los flavonoides se ha mostrado sobre dos mecanismos principales: el estrés oxidativo y la neuroinflamación, a través de modelos de muerte neuronal inducidos por el péptido Amiloide- β ($A\beta$), el cual juega un papel importante en la EA, y por la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) un modelo de EP. Las evidencias indican que los flavonoides son capaces de mantener la integridad y funcionalidad de las neuronas, además de prevenir el aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y así como la peroxidación de lípidos en el hipocampo de ratas. Por otra parte, los flavonoides también son capaces de bloquear la respuesta inflamatoria por medio de la inhibición de la microglia, la actividad de los astrocitos y moléculas pro-inflamatorias como la interleucina 1β ($IL-1\beta$), el factor de necrosis tumoral- alfa ($TNF-\alpha$) y la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS). Estudios recientes indican que la ingesta de flavonoides mejora los procesos cognitivos, particularmente el aprendizaje y la memoria, asociado a la activación de cascadas de señalización molecular que promueven la plasticidad sináptica y la neurogénesis en regiones de interés cognitivo como el hipocampo y la corteza cerebral. De tal manera, se sugiere que los flavonoides presentan un papel importante en la protección del cerebro, además de ser considerados- como una nueva

estrategia farmacológica que permita disminuir o prevenir el deterioro celular en los procesos neurodegenerativos que afectan drásticamente a la sociedad senil en México.

Palabras clave: Flavonoides, antioxidantes, óxido nítrico y neuroprotección.

Abstract

Flavonoids are compounds that are present in fruits, vegetables, and some drinks like wine, tea, beer, cocoa, and fruit juice. The reason for the growing interest in flavonoids is their wide pharmacological activity. Several neuroprotective effects have been described in pathological conditions such as cardiovascular ischemia, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, atherosclerosis, and cancer. Recently, because of their beneficial effects, the flavonoids have been considered in the therapeutics of neurodegenerative diseases such as the Alzheimer's (AD) and Parkinson's diseases (PD).

The neuroprotective effects of flavonoids have been proved in two principal mechanisms; oxidative stress and neuroinflammation. Flavonoids have been studied in models of toxicity, such as the neuronal death caused by the amyloid-beta peptide (A β), which is crucial in the development of AD, and that caused by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). The evidence suggests that flavonoids are molecules able to protect the integrity and function of neurons, and also prevent the production of reactive oxygen species (ROS) and lipoperoxidation in the hippocampus of rats. Flavonoids have been shown to inhibit the inflammatory response by the inhibition of the glia, astrocytosis, and proinflammatory molecules such as interleucine 1 β (IL-1 β), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) and the synthases of inducible nitric oxide (iNOS). Recent studies have shown that the intake of flavonoids improves the cognitive process, particularly learning and memory, by the activation of signaling cascades that promote neuronal plasticity and neurogenesis in the cognitive areas of the hippocampus and cortex. In this pathway it appears that flavonoids have a protective role in the brain, so that they can be considered as a new pharmacological strategy to decrease or prevent neuronal damage in the neurodegenerative processes that affect the brain in the aging of Mexicans.

Keywords: Flavonoids, antioxidants, nitric oxide, neuroprotection.

Introducción

En la búsqueda de las nuevas alternativas terapéuticas, actualmente se estudian diferentes compuestos fitoquímicos, presentes en comidas y bebidas. En particular se ha estudiado una clase de compuestos denominados flavonoides. Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos entre otros [1].

Los flavonoides se encuentran en las plantas y son los principales constituyentes de frutas, vegetales, y bebidas tal es el caso del vino, té, cacao, cerveza y el jugo de frutas cítricas. Estos compuestos polifenólicos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló la citrina de la cáscara del limón, con acción modificadora de la permeabilidad capilar. Estos extractos fenólicos atrajeron el interés de los farmacólogos cuando se describieron sus propiedades similares a las vitaminas. Por tal motivo se designaron como vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2 (porque algunos tenían propiedades análogas a la vitamina C). Sin embargo, como no fue posible confirmar que éstas fueran vitaminas, ambas designaciones se dejaron de usar alrededor de 1950 [2].

El creciente interés en los flavonoides se debe a su amplia actividad farmacológica, y se han descrito efectos protectores en diversas condiciones patológicas como la isquemia cardiovascular, la diabetes, la aterosclerosis y el cáncer. Recientemente se propone que los flavonoides por sus efectos benéficos podrían ser un tratamiento alternativo en las enfermedades Neurodegenerativas debido a que éstos son capaces de modular la función neuronal y prevenir la neurodegeneración. Además, el uso de flavonoides ha mostrado mejorar los procesos cognitivos, posiblemente mediante la protección de neuronas vulnerables a la muerte, así como a la mejora de la función neuronal existente [3, 4]. Dada la relevancia que los flavonoides han adquirido recientemente estos compuestos han sido incluidos en el tratamiento contra la degeneración neuronal presente en patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la Enfermedad de Parkinson (EP). Esta revisión bibliográfica integra de forma más amplia los mecanismos de acción que emplean los flavonoides para promover la neuroprotección en este tipo de padecimientos que afectan a gran parte de la población senil en México.

Síntesis y estructura de los flavonoides

Los flavonoides son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA. La reacción bioquímica que da origen a los flavonoides está controlada por dos enzimas: la chalcona sintasa y la chalcona flavonona isomerasa. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten una estructura común el difenilpirano (C6-C3-C6), que son compuestos con dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo heterocíclico C de pirano [5] (Figura 1A).

En función de sus características estructurales los flavonoides se pueden clasificar en seis principales grupos: 1. Los flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C. 2. Los flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C. 3. Las flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3. 4. Las antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. 5. Las isoflavonas, representados por la Genisteina que tiene dos grupos -OH unidos en la posición 1 y 3 del anillo C. 6. Los flavanonoles. Principalmente destaca la taxifolina, la cual se caracteriza por la unión de un grupo -OH al carbono 1,2 y 3 del anillo C [6] (Figura1).

Los flavonoides son compuestos fenólicos de 15 carbonos, que se distribuyen en el reino vegetal en más de 2.000 especies de muy diversas familias. En su estructura química contienen un número variable de grupos hidro-fenólicos, que son quelantes del hierro y otros metales de transición e incluso presentan una gran capacidad antioxidante que depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la acción inhibitoria de radicales hidroxilo y superóxido, altamente reactivos en la cadena de peroxidación lipídica. Tres son las características estructurales importantes para su función: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u o-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en la posición 2,3; c) la presencia de un grupo -OH en la posición 3 y 5 [7].

La quercetina y la catequina son los flavonoides que presentan una mayor actividad antioxidante, debido a sus propiedades estructurales. La quercetina presenta un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en la posición 3 del anillo C, mientras que la catequina posee un grupo -OH en la posición 3 del anillo C. Dicha estructura hace que ejerzan una acción inhibitoria contra los radicales hidroxilo y superóxido, que son los principales inductores de la peroxidación de lípidos [8].

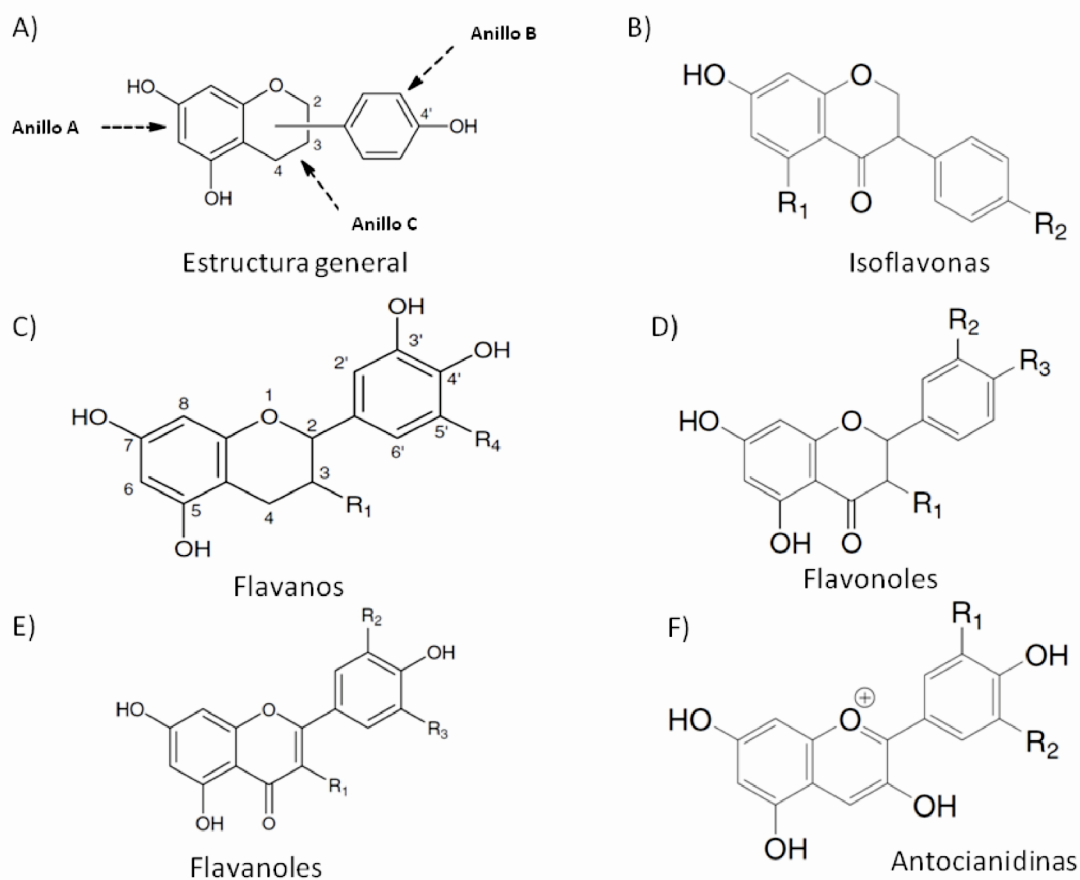


Figura 1. Estructura de los principales flavonoides. La diferencia entre ellos radica principalmente en el grupo -OH y en el grado de saturación que presenta el anillo C. En la imagen se muestran en A) la estructura general de flavonoides, B) Isoflavonas, C) Flavanos, D) Flavonoles, E) Flavanoles y F) Antocianidinas.

Efectos farmacológicos

La capacidad antioxidante de los flavonoides ha sido reconocida en diversos estudios, ya que estos compuestos pueden unirse a las enzimas transportadores de hormonas y al DNA. Además pueden quelar iones metálicos como el Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones y depurar los radicales libres [9]. Debido a su mecanismo de acción de estos fitoquímicos se han podido usar en patológicas como la diabetes *mellitus*, cáncer, cardiopatías, infecciones virales, úlceras, así también se les ha dado un uso como antialérgicos, antitrombóticos e incluso como antiinflamatorios. Se ha demostrado que protegen de la fotooxidación a la Vitamina E en la membrana celular, inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por lo que evitan la formación del ateroma y reducen la citotoxicidad de las LDL [10].

El efecto relajante vascular de los flavonoides es dependiente del endotelio y se ha descrito ser útil en diferentes patologías. Hasta este momento, el mecanismo de acción no es claro, sin embargo, se asocia con la síntesis del óxido nítrico (NO) y a la presencia de un grupo carbonilo en la posición 4 y su doble enlace C2-C3; que son requisitos indispensables para el efecto vasodilatador [11].

Diversos estudios *in-vitro* e *in-vivo* dan muestra del potencial de los flavonoides para proteger a las neuronas contra el daño provocado por diversas neurotoxinas. Su potencial neuroprotector se ha mostrado sobre dos mecanismos importantes: el estrés oxidativo y la neuroinflamación [12] a través de modelos de muerte neuronal, por ejemplo el modelo con el péptido Amiloide-beta (A β), el cual juega un papel importante en el desarrollo de la EA. También existen evidencias de que los flavonoides son capaces de mantener la integridad y funcionalidad de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y del núcleo estriado de roedores tratados con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una neurotoxina empleada para generar un modelo de EP. Por lo anterior, los flavonoides pueden ser empleados como agentes neuroprotectores en patologías como la EA y la EP, entre otras enfermedades degenerativas [13]. Es importante destacar que los mecanismos de neuroprotección de los flavonoides se deben en particular a su capacidad de interactuar con la señalización neuronal y su potencial para inhibir los procesos inflamatorios en el cerebro [14].

Mecanismos antioxidantes de los flavonoides en el Sistema Nervioso

La neurodegeneración parece ser provocada por eventos multifactoriales, que incluyen el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, la neuroinflamación, los incrementos en hierro y / o agotamiento de antioxidantes endógenos [15,16].

El estrés oxidativo se caracteriza por un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS/RNS), que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes que resulta en la disfunción y la muerte celular. Un estado de estrés oxidativo, causa en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis [17]. Estos eventos hacen totalmente vulnerable al sistema nervioso central (SNC) y finalmente se generan una serie de eventos que llevan su deterioro funcional.

La oxidación de lípidos está asociada con la disfunción neuronal, debido a que la composición lipídica de su membrana presenta un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados con respecto al resto de las células del cuerpo humano. La peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares, inicia un deterioro acumulativo de las funciones, disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y el aumento de la permeabilidad de la membrana para diferentes iones, entre los que destaca el Ca²⁺.

El aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular por periodos prolongados de tiempo activa proteasas, lipasas, endonucleasas y, además activa a la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), responsable de sintetizar al NO, el cual es una molécula importante en el progreso del estrés oxidativo que causa degeneración neuronal [17,18]. El péptido A β es uno de los factores implicados en el desarrollo de la EA y que influye en la formación de ROS, RNS, la peroxidación de lípidos, y la disfunción neuronal [19].

La quercetina es uno de los flavonoides con mayor potencial antioxidante.. Su capacidad antioxidante es de 4.7 mM, lo que resulta 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E (0.90 mM) y C (0.94 mM) [20]. La función antioxidante de la quercetina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina de manera que combinado éste, le permite mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo.

Se ha mostrado que la administración oral de epicatequina previene la formación de ROS y la peroxidación de lípidos provocados por la inyección del A β_{25-35} (secuencia de aminoácidos que posee efectos tóxicos del péptido A β) en el hipocampo de ratas macho [21]. Como se observa claramente en la figura 2, como en el grupo de epicatequina + A β_{25-35} los niveles de ROS y de peroxidación de lípidos es menor en comparación con el grupo únicamente inyectado con el A β_{25-35} .

Así mismo se indica que el consumo de té verde, rico en (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) atenúa la toxicidad inducida por la 6-OHDA. Además de evitar el daño en la estructura y función de la sustancia negra provocada por la inyección del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), una neurotoxina empleada en modelos para estudiar la EP [22]. Se ha demostrado que estos compuestos polifenólicos también pueden disminuir otros marcadores específicos de estrés oxidativo como los isoprotanos, 4-HNE y la 8-desoxiguanosina, además de quelar iones metálicos transitorios, tales como el Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres inducidos por diversas neurotoxinas inyectadas en el SNC [20].

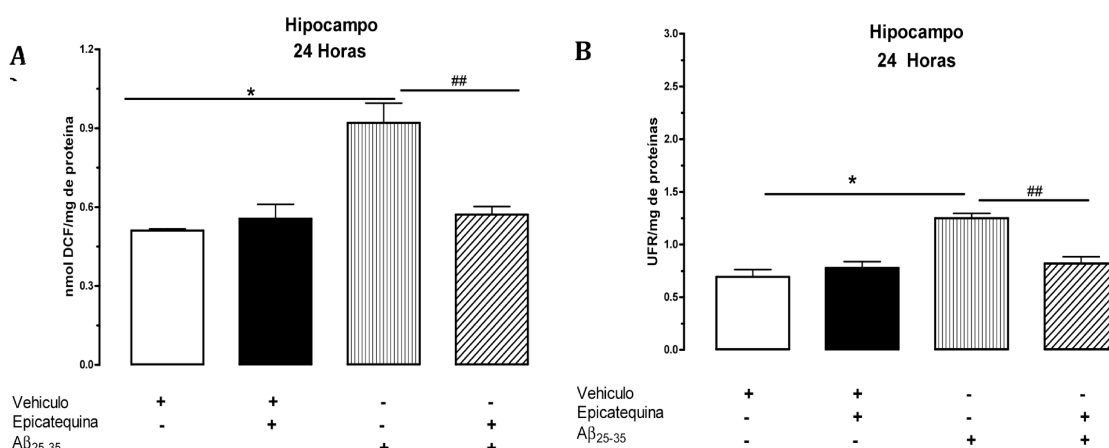


Figura 2. La administración de la epicatequina previene la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (A) y el aumento de la peroxidación de lípidos (B) que causa la inyección de la fracción A β_{25-35} 1 μ L/[100 μ M] en el hipocampo de ratas. La cuantificación se realizó 24 horas después de la administración de la epicatequina (30 mg/Kg, v.o.) y de la inyección del A β_{25-35} 1 μ L/[100 μ M] en el hipocampo de ratas. Los datos muestran la media \pm ESM de las unidades relativas de fluorescencia (URF) y de dihidrofluoresceína (DCF) por miligramo de proteína. ANOVA de una vía y una post-prueba de Tukey's. [21].

Por otra parte, recientes estudios indican que los flavonoides son efectivos en el bloqueo de estas especies oxidantes. También se cree que un número de proteína cinasas se activan por acción de estos compuestos, como la tirosina cinasa A (Akt), la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa activadora de mitógenos (MAPK), las cuales son responsables de generar cambios en la activación de caspasas y en la expresión de genes que promuevan la protección neuronal [23].

Se ha observado que los flavonoides pueden bloquear el estrés oxidativo inducido por el daño neuronal, así como la activación de la caspasa-3. Así, la epicatequina protege a las neuronas del daño oxidativo a través de un mecanismo que implica la inhibición pro-caspasa-3. Flavonas, como la hesperetina y su metabolito, 5-nitro hesperetina, inhiben la apoptosis neuronal por medio un mecanismo de fosforilación que activa vías de supervivencia [23]. Así mismo

estudios *in vitro* ha mostrado que la quercetina puede inhibir la actividad de las vías de las Jun amino-terminal cinasas (JNK) y de la apoptosis inducida por el peróxido de hidrógeno, el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), los cuales también están implicados de manera directa con la respuesta inflamatoria [20].

Mecanismos antiinflamatorios de los flavonoides

Los procesos inflamatorios en el SNC desempeñan un papel crucial en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. Se ha demostrado que la activación de las células gliales (astrocitos y microglia) conduce a la producción prolongada de citocinas pro-inflamatorias, además de otros mediadores que pueden contribuir a la activación progresiva de la apoptosis y provocar la muerte de las neuronas. Su modulación desencadena una cascada de eventos moleculares en la glia y en las neuronas, que activan la respuesta inflamatoria así como los mecanismos de síntesis para la producción de ROS.

El aumento en la producción de citocinas como la interleucina1-beta (IL-1 β), TNF- α , la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y el NO en las células gliales contribuyen de forma importante el proceso de la neurodegeneración. La sobre-activación de las MAPK, que regulan los eventos de transcripción de las NOs, IL-1 β y el TNF- α en células de la microglia y los astrocitos pudiese inhibirse por los flavonoides y así evitar la respuesta neuroinflamatoria. Estudios en cultivos celulares estimulados con el lipopolisacárido (LPS) muestran que la administración de quercetina, catequina y la galato de epigallocatequina (EGCG) bloquea la respuesta inflamatoria al inhibir la iNOS y la expresión de la ciclooxigenasa (COX-2), así como la producción de NO, la liberación de citocinas pro-inflamatorias, y la generación de ROS, en los astrocitos y la microglia. Estos extractos fotoquímicos también han demostrado inhibir a las MAPK como la p38 o ERK1/2, las cuales regulan la iNOS y el TNF- α , además de la activación de las células gliales [24].

El efecto de los flavonoides también puede influir en la activación de los factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF κ B), que responde a la señalización de p38, implicado en la inducción de iNOS, el cual es un factor determinante en la respuesta inflamatoria en el SNC [14] (Figura 3). Todos estos datos sugieren que los estos extractos fitoquímicos también poseen efectos antiinflamatorios, sin embargo el mecanismo responsable para dicho efecto no se conoce del todo.

Los Flavonoides mejoran el rendimiento cognitivo

En la actualidad hay un interés creciente en el potencial de los fitoquímicos para mejorar el aprendizaje, la memoria, y en general la capacidad cognitiva [25,26]. Un estudio reciente muestra que la ingesta de flavonoides en relación al desarrollo cognitivo ha proporcionado pruebas claras de que estos compuestos en la dieta está asociado con una mejora en el desempeño cognitivo [27].

El suplemento con isoflavonas ha mostrado un efecto favorable sobre las funciones cognitivas, en particular, la memoria verbal, en mujeres posmenopáusicas debido a su capacidad para imitar la acciones y funciones de los estrógenos en el cerebro [28,29].

Otra manera que los flavonoides participan en los cambios cognitivos es por medio del incremento de la concentración de acetilcolina, un neurotransmisor implicado directamente en los procesos de aprendizaje y memoria. Además, promueven el aumento de los factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), que también son responsables de modular los diferentes mecanismos moleculares que intervienen en el correcto desarrollo de la función cognitiva [30,31,32]. Al

parecer estos compuestos polifenólicos, parecen tener un marcado efecto sobre la memoria a corto plazo, y a largo plazo [33]. Las pruebas realizadas en ratas inyectadas con el péptido $A\beta_{25-35}$ y evaluadas en el laberinto radial de ocho brazos, muestran que la memoria espacial no se ve dañada a los 30 días después de la administración oral de epicatequina. La figura 4 muestra que el grupo epicatequina + $A\beta_{25-35}$ registran un porcentaje de respuestas correctas mayor al grupo inyectado únicamente con el $A\beta_{25-35}$ [21]. Estos hallazgos proporcionan pruebas contundentes de la eficacia que tienen los flavonoides en la mejora de los procesos de aprendizaje y memoria. Por otra parte estudios en animales de laboratorio también muestran que el consumo de alimentos ricos en flavonoides en particular con quercetina, son benéficos para revertir el curso degenerativo de las neuronas en el envejecimiento [21].

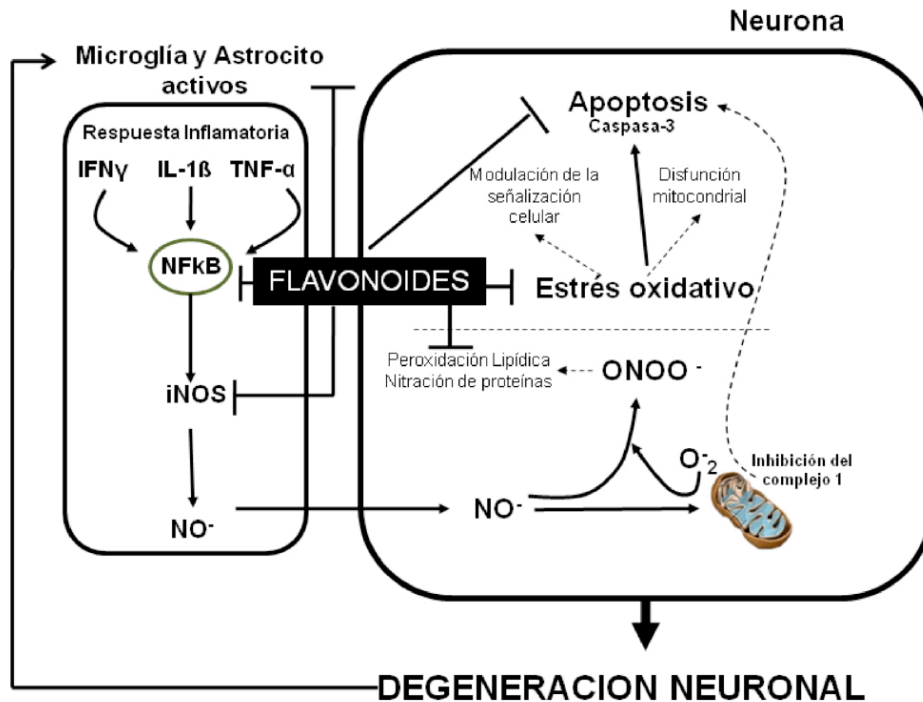


Figura 3. Mecanismo antioxidante y antiinflamatorio de los flavonoides en el SNC. Los mecanismos neuroprotectores de los flavonoides implican la capacidad de interactuar con la señalización neuronal y su potencial para inhibir los procesos de estrés oxidativo e inflamación en el cerebro que conducen a la degeneración neuronal. IFN γ : interferon gamma. IL1 β : interleucina 1 beta. TNF α : factor de necrosis tumoral alfa. NF κ B: factor nuclear kappa B. iNOS: sintasa del óxido nítrico inducible. NO: óxido nítrico. O $_2$: ion superóxido. ONOO $^-$: peroxinitrito.

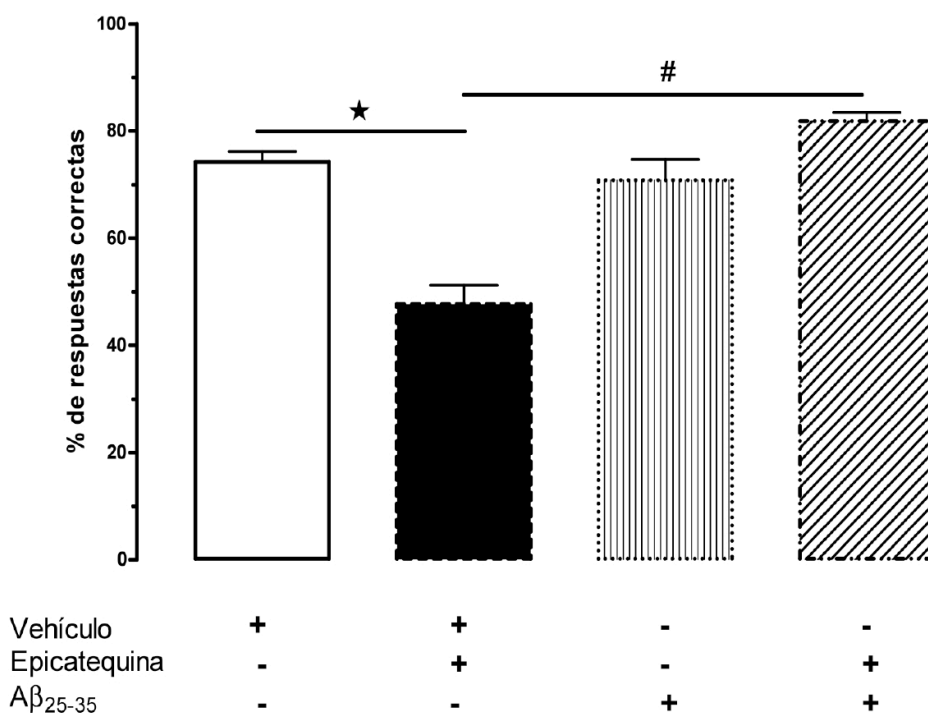


Figura 4. La administración de la epicatequina previene el daño en la memoria espacial que causa la inyección de la fracción Aβ₂₅₋₃₅ 1 μL/[100 μM] en el hipocampo de ratas. La prueba de memoria se evaluó en el laberinto radial de ocho brazos 30 días después de la administración de la epicatequina (30 mg/Kg, v.o) y de la inyección del Aβ₂₅₋₃₅ en el hipocampo de ratas. Los datos muestran la media ± ESM del porcentaje de respuestas correctas. ANOVA de una vía y una post-prueba de Tukey's [21].

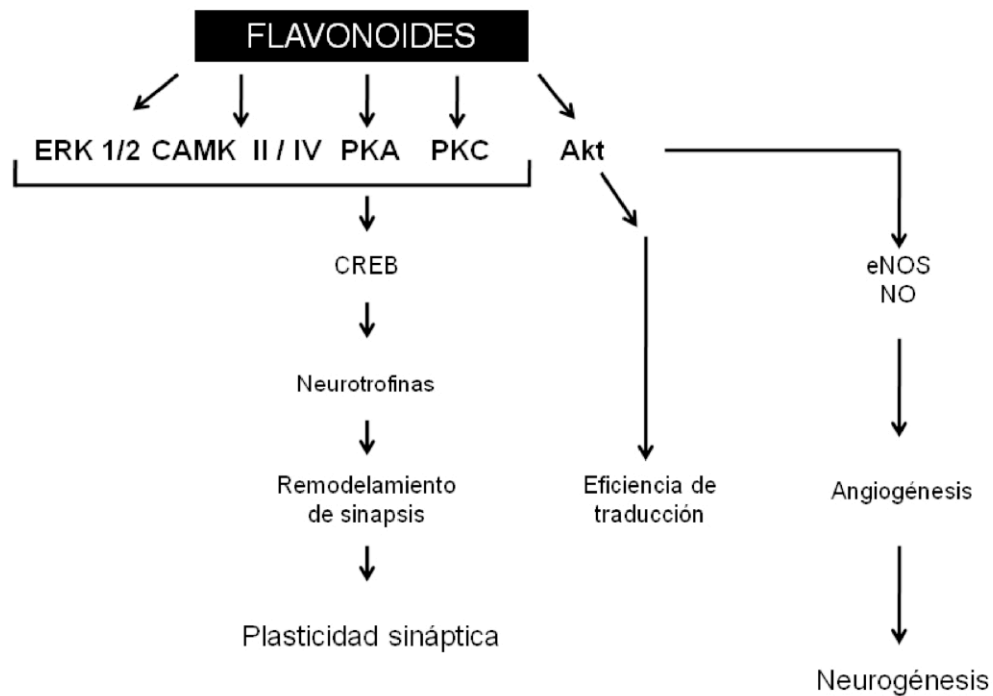
Los mecanismos farmacológicos por los cuales se promueve la mejora cognitiva aun no están claramente descritos. Sin embargo, se han sugerido como un posible mecanismo de acción que los flavonoides aumentan el flujo sanguíneo cerebral [34], y por lo tanto modular la fluidez del cerebro, además de interactuar con el sistema colinérgico muscarínico y proteger al sistema dopaminérgico del estriado [35].

La capacidad de los flavonoides para interactuar con la arquitectura celular responsables de modular el aprendizaje y la memoria, incluida la plasticidad sináptica, se debe a la activación de una serie de eventos moleculares que permiten una mayor conexión y comunicación neuronal [26].

Estudios *in vivo* muestran que la administración crónica de epicatequina, en combinación con el ejercicio físico mejora la memoria espacial, lo cual se debe a que existe un incremento en la proteína Akt que activa a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), promueve la angiogénesis, así como el aumento en la densidad neuronal en regiones como el giro dentado del hipocampo, un núcleo muy importante en el procesamiento de la memoria [36,37].

Por otra parte, se observa una mejora en la potenciación a largo plazo de ratones administrados con catequina aunado de una mayor activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (ERK), la proteína de unión a elemento de respuesta de AMPc (CREB) y de las calcio

calmodulinas cinasas II y IV (CAMKII y CAMKIV) [38,39]. Todos estos mecanismos están implicados con los procesos de plasticidad neuronal. Un incremento de CREB está asociado con un aumento en la plasticidad sináptica, que se ha demostrado porque existe una mayor conexión y comunicación neuronal cuando CREB está aumentado [25,40] (Figura 5). Por lo tanto se sugiere que el consumo de flavonoides es determinante para la mejora en la adquisición, el almacenamiento y la recuperación de la memoria.



SOBREVIVENCIA NEURONAL Y MEJORAS EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

Figura 5. Principales vías de señalización que activan los flavonoides para promover los procesos de supervivencia neuronal. Los flavonoides activan la vía de las ERK1/2, las CAMKs, PKA y PKC que originan cambios en la plasticidad sináptica. Además son capaces de influir en la neurogénesis por medio de la activación de la Akt- eNOS. ERK1/2: proteínas cinasas activadas por mitogeno. CAMK: calcio calmodulinas cinasas. PKA: proteína cinasas A. PKC: proteína cinasas C. Akt: tirosina cinasa A. eNOS: sintasas del óxido nítrico endotelial. NO: Óxido nítrico.

Comentario final

Han sido varios los trabajos publicados en la literatura mundial que resaltan los beneficios que tienen los flavonoides para prevenir el deterioro neuronal. Los resultados han sido claros en mostrar que los flavonoides tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. El consumo de alimentos ricos en flavonoides, como vino, té, cerveza, chocolate, etc., son los responsables directos de los efectos benéficos de estos compuestos. Su ingesta se ha relacionada con una disminución en los procesos neurodegenerativos evaluados en modelos *in vitro* e, *in vivo*, así como a nivel clínico. Hasta el momento se conocen dos principales mecanismos de neuroprotección: el antioxidante y el antiinflamatorio, responsables de modular directa o indirectamente la reparación de las neuronas por diferentes factores inductores del

daño neuronal. Hasta el momento no existe un tratamiento eficaz para las enfermedades neurodegenerativas, por lo que existe un gran interés en el desarrollo de medicamentos capaces de mejorar la función cerebral, y al parecer los flavonoides representan moléculas importantes en la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que afectan drásticamente a la población senil en México.

Referencias

1. Duthie, G. y Crozier, A. (2000) *Current. Opinion. Clinical. Nutrition. Metabolic. Care.* **3**, 457-471
2. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. y Tuñón, M.J. (2002) *Nutr. Hosp.* **17**, 271-278
3. David, V., Katerina, V., Rodríguez-Mateos, A., Catarina, R. y Jeremy, P. (2008) *Genes. Nutr.* **3**, 115-126
4. Commenges, D., Scotet, V. y Renaud, S. (2000) *Eur. J. Epidemiol.* **16**, 357-363
5. Manach, C., Scalbert, A. y Morand, C. (2004) *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747
6. Harborne, J.B. y Baxter, H. (1999) Vol 1. Wiley Europe 1999.1800
7. Pérez-Trueba, G. (2003) *Rev. Cubana. Invest. Biomed.* **22**, 48-57
8. Formica, J.V. y Regelson, W. (1995) *Food. Chem. Toxicol.* **33**, 1061-1080
9. Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G. y Hara, Y. (1998) Antioxidant propertie of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoide radicals. En: Rice Evans C, Parker L (eds.): *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, Nueva York, 137-161
10. Infante, R. (1997) *Clin. Invest. Arterioesclerosis.* **9**, 19-22
11. Rimm, E.R., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M. y Willet, W. (1996) *Ann. Intern. Med.* **125**, 384-389
12. Youdim, K.A. y Joseph, J.A. (2001) *Free. Radic. Biol. Med.* **30**, 583-594
13. Luo, Y., Smith, J.V. y Paramasivam, V. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 12197-12202
14. Chen, J.C., Ho, F.M. y Pei-Dawn, L.C. (2005) *Eur. J. Pharmacol.* **521**, 9-20
15. Barzilai, A. y Melamed, E. (2003) *Trends. Mol. Med.* **9**, 126-132
16. Jellinger, K.A. (2001) *J. Cell. Mol. Med.* **5**, 1-17
17. Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Science Publication 3rd ed. 1999.
18. Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998) *Am. Physiol. Soc.* (1998) **78**, 547-581
19. Luo, Y., Smith, J.V. y Paramasivam, V. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 12197-12202
20. Mandel, S. y Youdim, M.B. (2004) *Free. Radic. Biol. Med.* **37**, 304-317
21. Cuevas, E., Limón, D., Pérez-Severiano, F., Díaz, A., Ortega, L., Zenteno, E. y Guevara J. (2009) *Eur. J.Pharmacol.* **616**, 122-127
22. Levites, Y., Youdim, M.B. y Maor, G. (2002) *Biochem. Pharmacol.* **63**, 21-29
23. Schroeter, H., Spencer, J.P. y Rice-Evans, C. (2001) *Biochem. J.* **358**, 547-557
24. Kozuka, N., Itofusa, R., Kudo, Y. (2005) *J. Neurosci. Res.* **82**, 717-728
25. Spencer, J.P.E. (2003) *J. Nutr.* **133**, 3255S-3261S
26. Spencer, J.P.E. (2008) *Flavonoids. Br. J. Nutr.* **99**, (E Suppl 1). ES60-ES77
27. Letenneur, L., Proust-Lima, C. y Le, G.A. (2007) *J. Neurochem.* **78**, 1073-1082
28. File, S.E., Jarrett, N. y Fluck, E. (2001) *Psychopharmacology. (Berl).* **157**, 430-436
29. Lee, Y.B., Lee, H.J., Sohn, H.S. (2005) *J. Nutr. Biochem.* **16**, 641-64
30. Pan, Y., Anthony, M. y Clarkson, T.B. (1999) *Neurosci. Lett.* **261**, 17-20
31. Pan, Y., Anthony, M. y Clarkson, T.B. (1999) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **221**, 118-125
32. Williams, C.M.E.I., Mohsen, M.A. y Vauzour, D. (2008) *Free. Radic. Biol. Med.* **45**, 295-305
33. Pan, Y., Anthony, M. y Watson, S. (2000) *Menopause.* **7**, 230-235
34. Casini, M.L., Marelli, G. y Papaleo, E. (2006) *Genes. Nutr.* **85**, 972-978
35. Chopin, P. y Briley, M. (1992) *Psychopharmacology.* **106**, 26-30
36. van Praag, H., Lucero, M.J. y Yeo, G.W. (2007) *J Neurosci.* **27**, 5869-5878
37. Spencer, J.P.E. (2007) *Gen. Nutr.* **2**, 257-273

38. Maher, P., Akaishi, T. y Abe, K. (2006) *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727–747
39. Schroeter, H., Spencer, J.P. y Rice-Evans, C. (2001) *Biochem. J.* **358**, 547–557
40. Reznichenko, L., Amit, T. y Youdim, M.B. (2005). *J. Neurochem.* **93**, 1157–1167

Semblanza del Dr. Daniel Limón



El Doctor Ilhuilcamina Daniel Limón Pérez de León, egresado de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP en 1983 como Químico Farmacobiólogo. Realizó estudios de maestría en Farmacología de la conducta en la Facultad de Estudios Superiores de la UNAM en 1998, enfocado a comprender los mecanismo bioquímicos que participan en los procesos de aprendizaje y memoria en humanos y roedores. Obtuvo el grado de Doctor en ciencias en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN en 2009, en donde estudio los mecanismos bioquímicos y conductuales que causa la toxicidad del péptido Amiloide beta, considerado un importante factor etiológico de la enfermedad de Alzheimer. Además ha realizado estancias de investigación en el Departamento de Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV donde abordó diferentes aspectos moleculares y electrofisiológicos de la enfermedad de Parkinson. Desde hace 23 años es profesor del departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, imparte materias como Fisiología, Farmacología, Toxicología así como Análisis Biológico y de diagnóstico. Actualmente es coordinador del área de Bioquímica y Biología Molecular del posgrado en Ciencias Químicas de la BUAP. Es fundador y jefe del laboratorio de Neurofarmacología de la Facultad de Ciencias Químicas desde 1995. De las líneas de investigación que dirige en su laboratorio resalta: 1) El estudio *in vivo* de la toxicidad del péptido amiloide-beta como modelo para entender la enfermedad de Alzheimer. 2) El estudio de nuevas alternativas farmacológicas en la terapéutica de enfermedades neurodegenerativas. 3) El estudio y caracterización de los receptores de anandamida. Cuenta con un número considerable de publicaciones nacionales e internaciones en revistas de alto impacto, además de colaborar en la redacción de capítulos de libros afines al área. Es SNI nivel 1 y es reconocido en la BUAP por su gran labor en la formación de recursos humanos a nivel licenciatura y posgrado.

ANEXO

Nuevos enfoques metodológicos



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXIV, 2010, 157-164. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA *IN SITU* CON EL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

Luis Felipe Jiménez-García¹, Alma Zamora-Cura^{1,2}, Nadia Gutiérrez-Quintanar³, Ernesto Villalobos-Nájera⁴, María de Lourdes Segura-Valdez¹

¹Laboratorio de Nanobiología Celular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F., México

²Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM

³Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex)

⁴Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM)

luisfelipe_jimenez@ciencias.unam.mx

Resumen

La expresión genética se ha analizado principalmente por medio de técnicas bioquímicas y moleculares in vitro. Combinadas con técnicas de microscopía producen una visión de los procesos in situ, es decir, en compartimientos celulares. Aunque hay gran cantidad de trabajos con los microscopios de luz y electrónico, se conoce menos sobre la estructura celular con el microscopio de fuerza atómica. En este trabajo se revisa la posibilidad de estudiar la estructura celular con este instrumento, lo que puede favorecer el análisis de la expresión genética in situ.

Palabras clave: AFM, expresión genética, microscopio de fuerza atómica, núcleo.

Abstract

Gene expression has been mainly analyzed by in vitro biochemical and molecular approaches. Combined with microscopy techniques, these methods produce an in situ view of the processes, it is to say within the cell compartments. Although there are many efforts made with the light and electron microscopes, there are few data on cell structure by atomic force microscopy. Here we review the possibility to study cell structure by atomic force microscopy, an aspect that would help in analyzing in situ gene expression.

Keywords: AFM, atomic force microscope, gene expression, nucleus.

Introducción

El microscopio de fuerza atómica fue inventado en 1982 [1]. Pertenece a una familia de microscopios cuyo origen es el microscopio de efecto túnel cuatro años antes [2]. Gerd Binnig y Heinrich Rohrer recibieron el premio Nobel de Física en 1986, solamente cuatro años después de su invento, compartiéndolo con Ernst Ruska, por inventar el microscopio electrónico con Max Knoll en los inicios de los años 1930.

Principios de Microscopía de Fuerza Atómica

El microscopio de fuerza atómica es el más versátil de la familia de microscopios conocida como microscopios de barrido por sonda (*scanning probe microscopes*, SPMs) [3]. El poder de generar imágenes de sistemas biológicos en tiempo real, bajo condiciones naturales o fisiológicas con una resolución molecular, e incluso submolecular, es de interés para las ciencias biológicas [3]. El microscopio de fuerza atómica cumple con estas expectativas y es más que una herramienta que genera imágenes tridimensionales de la ultraestructura de una superficie con resolución molecular. El microscopio puede medir las propiedades físicas de la muestra, tales como interacciones moleculares, hidrofobicidad de la superficie, cargas en la superficie y propiedades mecánicas. Estas características permiten una nueva forma de observar la relación entre la estructura y la función en diferentes sistemas biológicos [4].

El microscopio de fuerza atómica es similar en su concepción al microscopio de barrido de efecto túnel (*scanning tunnelling microscope*, STM) [3] (Figura 1).

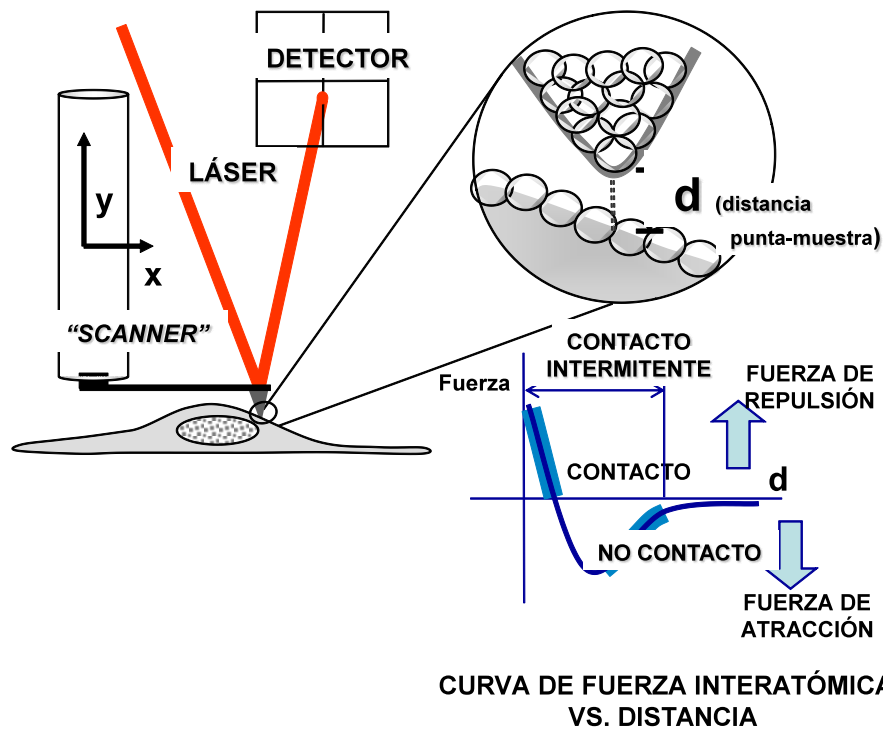


Figura 1. Esquema que representa el principio del microscopio de fuerza atómica (ver texto).

Las imágenes de microscopio de fuerza atómica no se obtienen por medio de la incidencia de luz como en los microscopios clásicos. Este microscopio lo hace midiendo los cambios en la magnitud de la interacción entre la sonda y la superficie de la muestra, conforme la muestra es barrida en dirección de los ejes “x” y “y” [3,4].

La sonda consiste en una punta extremadamente fina cuyo radio de curvatura es del orden de los 100 Å y que se encuentra montada en un extremo de un cantiléver (o viga o ménsula) que a su vez está unido a una pequeña base de vidrio para facilitar su manejo. Tanto la punta como el cantiléver generalmente son de silicio o nitruro de silicio. El cantiléver cumple con la función de permitir que la punta se mueva arriba y abajo conforme recorre la muestra tanto vertical como horizontalmente. La deflexión del cantiléver se mide utilizando un método óptico con alta resolución. Este consiste de un rayo laser que incide en el cantiléver. La posición del rayo que se refleja es detectada por un fotodiodo. En los microscopios modernos, el fotodiodo se encuentra dividido en cuatro segmentos. Conforme la punta se mueve en respuesta a la topografía de la muestra durante el barrido, el ángulo del laser reflejado cambia y así mismo el punto de incidencia del laser en el fotodiodo se mueve, produciendo cambios en la intensidad en cada uno de sus cuadrantes [3,4].

El mecanismo de barrido se lleva a cabo por un efecto piezoeléctrico reverso. Si las diferentes caras de un cristal piezoeléctrico son sometidas a una diferencia de potencial, el cristal modifica su forma. Los materiales piezoeléctricos empleados en microscopía de fuerza atómica para conformar un tubo piezoeléctrico son cerámicas generalmente del tipo PZT (*lead zirconate titanates*). En consecuencia, el tubo piezoeléctrico consiste en una pared delgada de cerámica piezoeléctrica dura que es polarizada radialmente. Se colocan electrodos a las caras internas y externas del tubo, así al aplicar un bajo voltaje entre la cara interna y los electrodos externos el

tubo se expandirá o contraerá y se moverá por ejemplo en el eje “z”. Si se aplica un bajo voltaje solo a uno de los electrodos externos, el tubo se moverá en las direcciones “x” y “y” [3].

Finalmente la forma en la que se genera la imagen que se presenta en la pantalla de una computadora depende de un controlador cuya función es transformar la información analógica a información digital y viceversa [3].

La expresión genética *in situ*

La expresión genética en eucariontes se puede resumir en el diagrama del dogma central de la biología molecular o flujo de información genética. El flujo resume el doble papel principal del DNA en los seres vivos, es decir, el copiado del material genético o DNA mediante la replicación semiconservativa y la expresión de los genes por medio de la transcripción y la traducción (Figura 2).

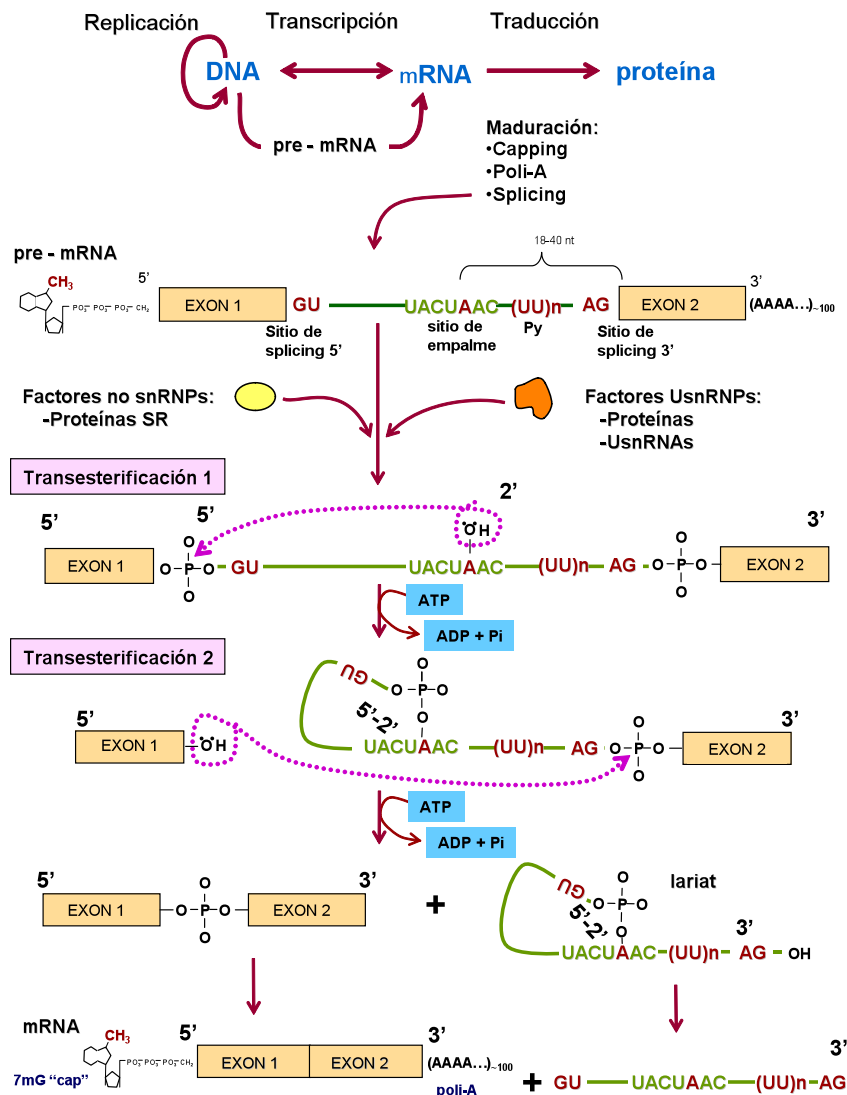


Figura 2. Esquema del flujo de información genética, llamado originalmente el dogma central de la biología molecular. Se resalta la parte de expresión genética (tomado de [5]).

En los eucariontes, la transcripción produce una molécula de RNA precursora que madura a través de una serie de pasos conocidos en conjunto como el procesamiento del pre-RNA. Debido a que estos procesos ocurren en estructuras celulares, la determinación de los eventos moleculares en las células se denominan eventos *in situ*. Como primer paso para estudiar los sustratos morfológicos de la expresión genética, se requiere generar imágenes de las estructuras con suficiente resolución. En este trabajo se presentan resultados obtenidos sobre la estructura celular general y nuclear en particular. La estructura celular y su relación con la expresión genética se ha presentado anteriormente por medio de microscopía de luz y electrónica de transmisión [5].

Análisis de la estructura celular con el microscopio de fuerza atómica

La estructura de la célula se ha analizado en células completas en cultivo o en cortes de material preparado para microscopía electrónica de transmisión. En el primer caso no se puede estudiar la estructura interna debido a que la punta del microscopio barre la parte superficial y solamente se puede acercarse a la membrana plasmática (Figura 3).

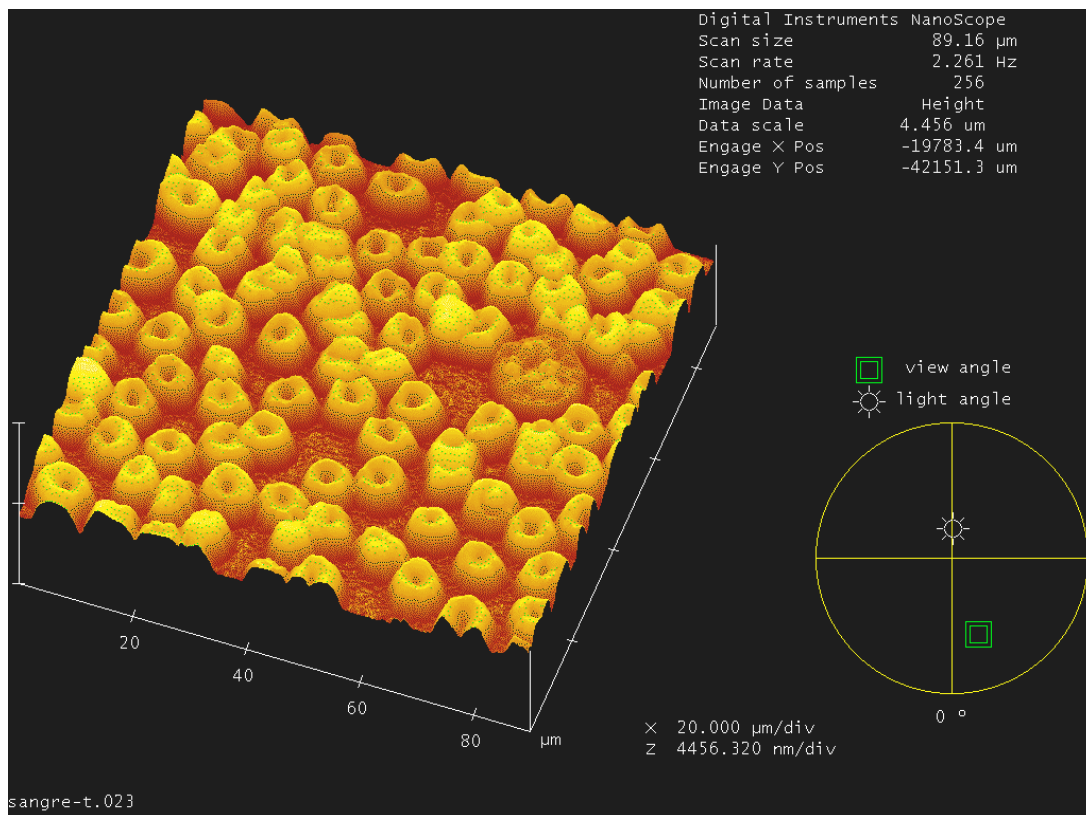


Figura 3. Micrografía de Fuerza Atómica de eritrocitos humanos. Las células rojas se distinguen por su concavidad.

Se ha propuesto una técnica que utiliza cortes de material preparado para microscopía electrónica de transmisión. Los cortes semifinos teñidos o no con azul de toluidina, obtenidos con un ultramicrotomo se colocan sobre portaobjetos de vidrio y se analizan con el microscopio de fuerza atómica, trabajando en modo de contacto o intermitente [6-9].

El principio de la técnica se ilustra en la Figura 4.

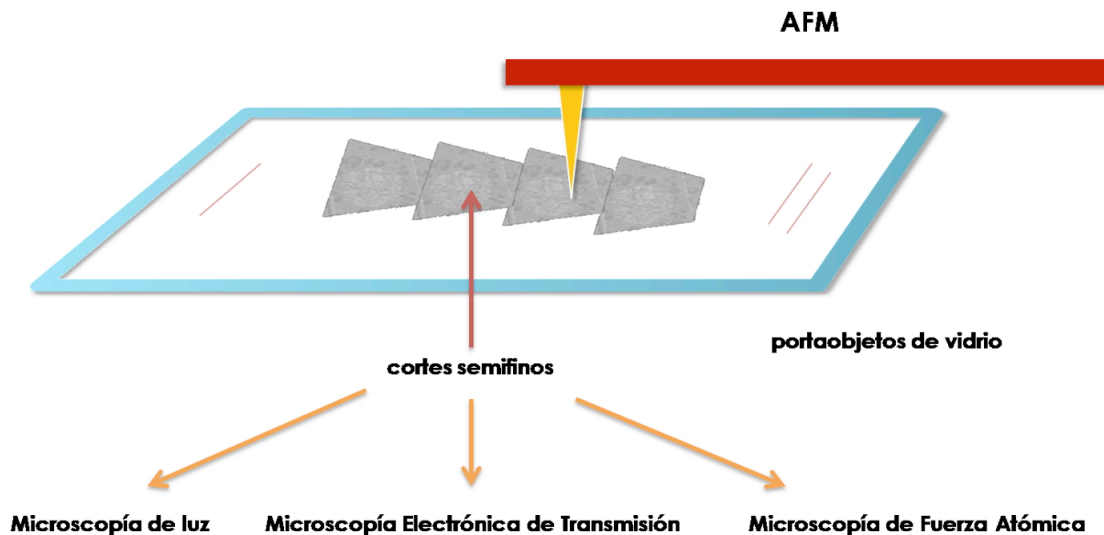
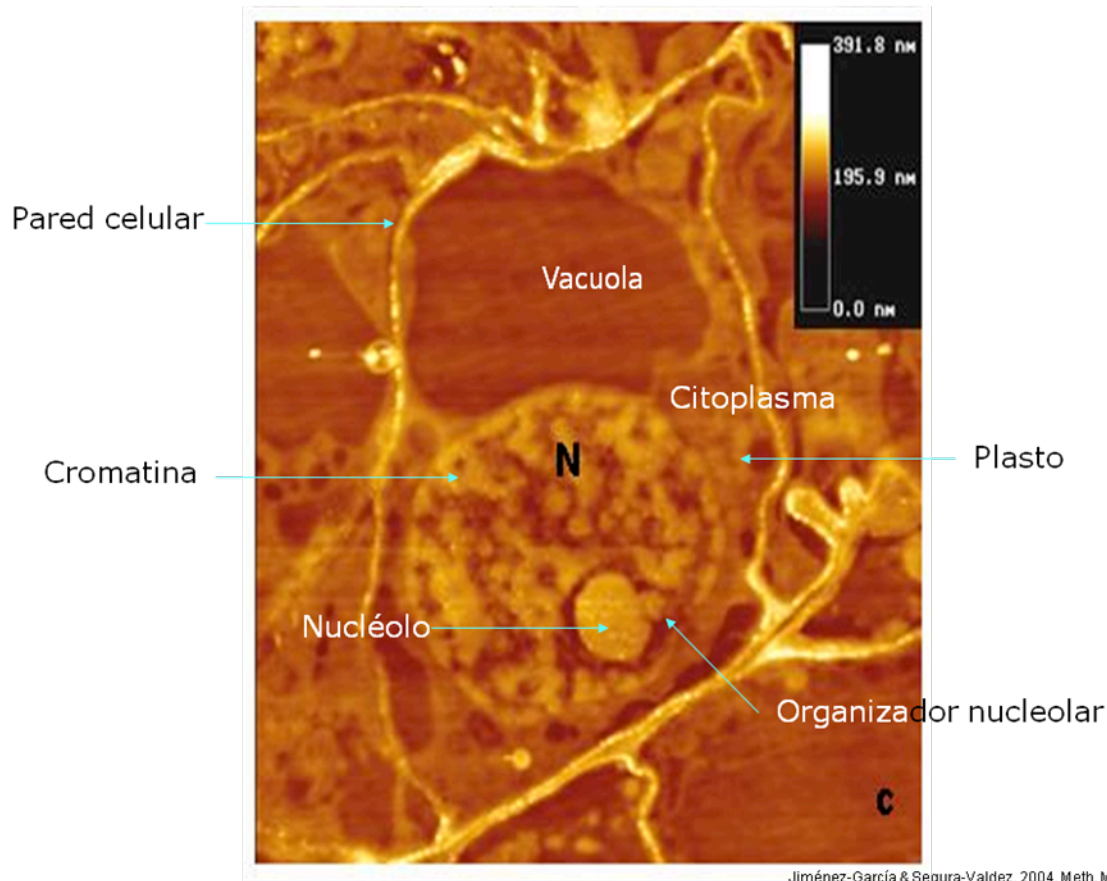


Figura 4. Técnica para obtener micrografías de fuerza atómica a partir de cortes semifinos colocados sobre portaobjetos de vidrio. El microscopio de fuerza atómica (AFM) barre cada uno de los cortes generando la imagen de la superficie de cada uno.

Con este enfoque, se han obtenido imágenes de la estructura de las células, con énfasis en el núcleo celular (Figura 5). En la Figura se aprecia el genoma en forma de cromatina compacta y el nucleoplasma adyacente en una célula del ovario de la planta *Lacandonia schismatica*.

Perspectivas

Ahora que la estructura celular y en particular la estructura del núcleo se pueden visualizar con el microscopio de fuerza atómica, podrá analizarse con mayor detalle la zona de expresión genética en el nucleoplasma. Recientemente se han obtenido imágenes de las partículas nucleares conocidas como gránulos de *Lacandonia* [12].



Jiménez-García & Segura-Valdez, 2004, Meth. Mol. Biol

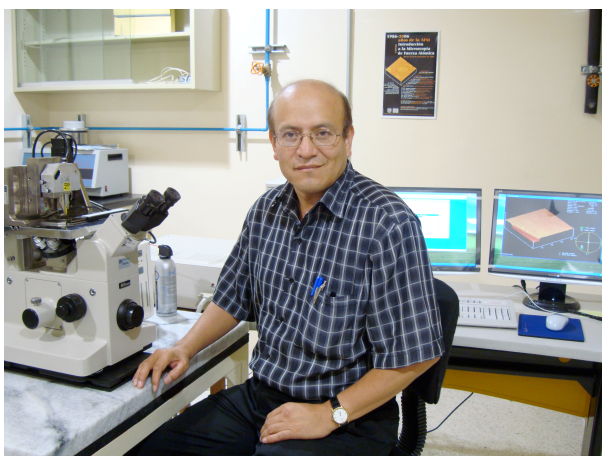
Figura 5. Micrografía de fuerza atómica de una célula de la flor de *Lacandonia schismatica*. Entre la cromatina se observan espacios relacionados con la expresión genética (ver referencia [9]).

Referencias

1. Binnig, Quate, C.F. y Gerber, Ch. (1986) *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933
2. Binnig, G. y Rohrer, E. (1982) *Phys. Rev. Lett.* **45**, 123-123
3. Morris, V.J., Kirby, A.R. y Gunning, A.P. (2008) *Atomic Force Microscopy for biologists*. Imperial College Press, England
4. Dufrêne, Y.F. (2008) *J. Bacteriol.* **184**, 5205-5213
5. Jiménez-García, L.F., Lara-Martínez, R., Gil-Chavarría, I., Zamora-Cura, A., Salcedo-Alvarez, M., Agredano-Moreno, L.T., Moncayo-Sahagún, J.J. y Segura-Valdez, M.L. (2007) *Mensaje Bioquímico* **31**, 141-156.
6. Jiménez García, L.F., Reynoso Robles, R., Fragosos Soriano, R., Agredano Moreno, L.T., Segura Valdez, M.L., González Moreno, S., Ramos, C.H., Martínez, E. (1998) *Bol. Soc. Bot. Méx.* **62**, 5-14
7. Jiménez-García, L.F. y Fragoso-Soriano, R. (2000) *J. Struct. Biol.* **129**, 218-222
8. Jiménez García, L.F., Fragoso Soriano, R.J. y Segura Valdez, M.L. (2001) *La microscopía de fuerza atómica en el estudio de células y tejidos de plantas*. pp. 215-221. En: Uribe-Aranzábal, M.C. y García-Lorenzana, M. (eds). Nuevos retos de la docencia y la investigación en Histología. Sociedad Mexicana de Histología, México
9. Jiménez-García, L.F. and Segura-Valdez, M. de L. (2004) *Meth. Mol. Biol.* **242**, 191-199
10. Jiménez-Ramírez, R., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M. de L. and Jiménez-García, L.F. (2002) *Biol. Cell* **94**, 511-518

11. Segura-Valdez, M.L., Cruz-Gómez, S.J., López-Cruz, R., Lara-Martinez, R., Agredano-Moreno, L.T. y Jimenez-Garcia, L. F. (2006) *TIP Rev. Esp. Cien. Qím-Biol.* **9**, 30-33
12. Fragoso-Soriano, R., Vázquez-López, C., Pérez-García, B. y Jiménez-García, L.F. (2009) *J. Scann. Probe Microsc.* **4**, 73-77

Semblanza del Dr. Luis Felipe Jiménez García



Es profesor titular del departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Es biólogo, maestro y doctor en ciencias de la UNAM. Realizó su tesis doctoral en el Departamento de Farmacología del Baylor College of Medicine en Houston Texas. Posteriormente llevó a cabo una estancia postdoctoral en el Laboratorio de Cold Spring Harbor.

Es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias y presidente de la Sociedad Iberoamericana de Biología Celular. Ha impartido unos 200 cursos de licenciatura, posgrado y extracurriculares y ha escrito varios libros de docencia y capítulos de libro

internacionales. Su producción científica incluye artículos publicados en *Cell*, *Molecular Biology of the Cell*, *Journal of Cell Sciences*, etc. Sus trabajos han sido citados más de 700 ocasiones. Entre sus aportes están el descubrimiento de una nueva estructura celular en el núcleo de plantas y el hallazgo del nucléolo más pequeño de la naturaleza en *Giardia lamblia*. Ha dirigido 29 tesis. Ha impartido varias conferencias en instituciones nacionales y en otros países.

El Dr. Jiménez fue presidente de la Sociedad Mexicana de Biología Celular y de la Asociación Mexicana de Microscopía, así como parte del Comité Interamericano de Sociedades de Microscopía. Actualmente es miembro del Consejo Directivo de la Academia Mexicana de Profesores de Ciencias Naturales. Recibió la Distinción Universidad Nacional en Docencia en Ciencias Naturales en 1998, la Cátedra Iztacala en 2009 por parte de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y la Cátedra Magistral en Educación "Juan de Dios Bátiz Paredes" que otorga el Colegio de Sinaloa, durante 2009 y 2010.

El Dr. Jiménez fue coordinador de investigación y coordinador general del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias. También ha sido consejero técnico y consejero universitario de la UNAM.

FRET: Aplicaciones en la biomedicina

Dr. Robert Dunakin

Aspelab



Fluorescencia de Transferencia Resonante de Energía (**FRET**).

Es una técnica de vanguardia en la Nanotecnología que permite comprender las interacciones entre las proteínas y moléculas en proximidades de 1 a 10 nanómetros de distancia de la resolución de la microscopía de luz.

El principio:

Un fluoróforo excitado, llamado donador, transfiere, de su estado excitado, energía a una molécula receptora que la absorbe. Esta transferencia de energía no es radiactiva. La sensibilidad de la emisión es un método establecido para la evaluación de **FRET** eficiente. Se puede aplicar a las células vivas, así como a las muestras fijas.

El método:

Dado que este método no es invasivo, es de uso más frecuente para experimentos con células vivas. Debido a la interferencia, los controles y complejos cálculos de corrección, son inherentes al método. Las mediciones se realizan mediante la detección de las señales fluorescentes del donante y **FRET**, así como del receptor, escaneando línea por línea de forma para la exploración.

Las condiciones apropiadas de excitación desempeñan un papel importante. En la primera secuencia, la molécula donante debe ser excitada para generar la energía que transmitirá a la molécula receptora, y sensibilizar la emisión de la receptora. En la segunda secuencia, La excitación del receptor es selectiva ya que crea la fluorescencia final.

Las preparaciones de **FRET** deben incluir referencias de los donantes en la ausencia del receptor (donante de control) y receptor en ausencia del donante (receptor de control).

Idealmente, todas las referencias se incluyen en la misma preparación. El donante y receptor de las referencias se utilizan para obtener coeficientes de calibración para corregir la excitación y emisión durante el cruzamiento de señal.

Es importante tener en cuenta que durante todo el experimento y rutina la calibración, de todos los parámetros de medición tales como el aumento de emisiones, ventana de detección, intensidad de excitación, el zoom y formato de velocidad de exploración.

Técnicas de microcalorimetría para el análisis de proteínas

M. en C. Luis Sánchez

Accesolab



La calorimetría por titulación isotérmica (ITC por las siglas en inglés Isothermal titration calorimetry) es una técnica “universal” para la medición directa de los cambios de calor asociados a la unión específica entre dos biomoléculas de cualquier naturaleza. Los instrumentos ITC han probado ser una herramienta analítica muy poderosa para medir los parámetros termodinámicos de afinidad usando una técnica en solución y libre de marcaje. Los sistemas ITC son ampliamente usados en áreas como el desarrollo de fármacos, la caracterización de anticuerpos, el desarrollo de productos bioterapéuticos y ampliamente en la investigación básica en el área de ciencias de la vida. Entre sus principales aplicaciones se pueden mencionar:

- determinación de las constantes de afinidad
- medición de las concentraciones activas
- caracterización del mecanismo de acción
- confirmación de la unión del fármaco a la molécula blanco
- medición de los parámetros de cinética enzimática
- determinación de la especificidad de unión y la estequiometría

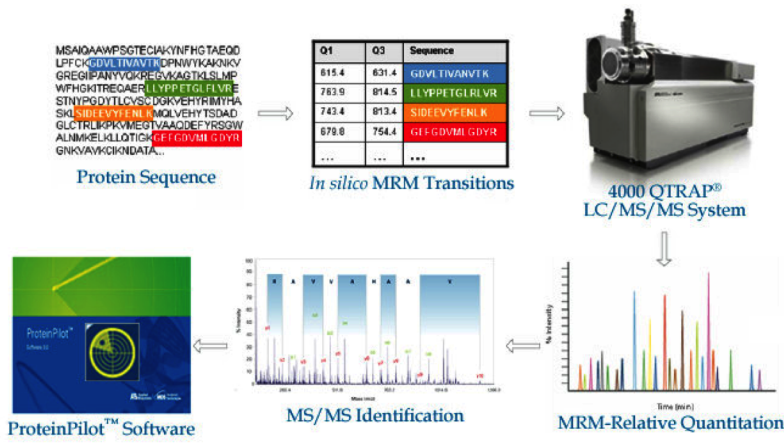
La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés Differential scanning calorimetry) mide el intercambio de calor que ocurre en las biomoléculas durante cambios controlados de temperatura. Los instrumentos DSC aplican en principio de medición de la entalpía (ΔH) de desnaturalización por calor, lo cual representa una herramienta muy útil para monitorear y comprender los factores que participan en la estabilidad de los sistemas biológicos. Los sistemas DSC tienen aplicaciones en áreas como el desarrollo de fármacos, la caracterización de anticuerpos, desarrollo y producción de biofármacos así como en la investigación básica de las ciencias de la vida. Entre algunas de sus aplicaciones se pueden incluir:

- Caracterización y selección de los candidatos más estables de posibles variaciones y/o modificaciones de una proteína o biofármaco
- Rápida optimización de las condiciones de purificación y producción
- Determinación fácil y rápida de las condiciones óptimas de una formulación líquida
- Medición de las constantes de afinidad para interacción “ultra-tight”

“Señalización, fosforilación y caracterización de péptidos y proteínas por Espectrometría de Masas”

Resumen

Una gran cantidad de proteínas eucarióticas sufren de modificaciones post-traduccionales (PTMs, Post-Translational Modifications) moduladas finamente por las condiciones de tiempo y espacio dentro de la célula, tejido u organismo, respondiendo a condiciones de estrés o estímulos específicos para traducir una señal hormonal, olfatoria, de alerta, etc. [1,6]. La mayoría de estas proteínas, normalmente sufren diferentes tipos de PTMs y hasta el momento se conocen más de 200 reportadas [2-9], y el gran reto tecnológico es poder detectar el mayor número posible de estas de manera eficiente, rápida, reproducible y económica.



Probablemente, la PTM más estudiada y más abundante es la fosforilación, llevada a cabo por proteínas cinasas (más de 500 especies en humanos) y regulada directamente por proteínas fosfatasa (alrededor de 150 especies en humanos). Se estima que el 50% de todas las proteínas pueden sufrir fosforilaciones y se calcula que existen más de 100,000 sitios de fosforilación en el proteoma humano [5,6]. La unión covalente de un grupo fosfato se lleva fundamentalmente en tres residuos (aminoácidos): Tirosina (Tyr, Y), Serina (Ser, S) y Treonina (Thr, T); y ésta fosforilación dentro de la proteína establece la fina modulación necesaria para regular su actividad, localización, función, propiedades estructurales, degradación, asociaciones con otras proteínas o lípidos, translocación, etc. Además, se ha visto que estas fosforilaciones juegan un papel muy importante en las decisiones celulares como el ciclo celular, “muerte celular programada” o apoptosis, diferenciación, efecto en la traducción y transcripción, y en eventos como el aprendizaje y la memoria en las neuronas, padecimientos cardiacos, diabetes y muchos más [1,5]. Por todo esto, la identificación y caracterización de los sitios fosforilados en una proteína es crucial para entender los eventos de señalización que ocurren bajo estas circunstancias patológicas o inducidas [6].

Trabajos previos, han dado evidencias suficientes para sugerir que las proteínas pueden ser multi-fosforiladas y no en forma aleatoria, en muchas ocasiones en forma secuencial o predeterminada para llevar a la función, activación, asociación, etc. de la proteína [1]. Además, es importante determinar no solo el nivel de fosforilación global, sino descubrir los sitios y el porcentaje de fosforilación en cada uno de los residuos dentro de la secuencia [5]. En múltiples ocasiones el uso de softwares predictivos puede ser una herramienta útil para el descubrimiento de sitios putativos de fosforilación (UniProtKB, Phospho.ELM, PHOSIDA, SysPTM), sin embargo no son 100% confiables, y requieren de estudios posteriores para su identificación, detección o confirmación. Las técnicas más utilizadas para la detección de sitios fosforilados en proteínas y péptidos es el uso de anticuerpos sitio-específicos (por Western blot, inmunoprecipitaciones, etc.) o el uso de radioisótopos (en ensayos *in vitro* o *in vivo*) como fósforo inorgánico [³²P_i] para experimentos de marcaje metabólico y de pulso-caza; y [³²P-γ]-ATP para elucidar los residuos fosforilados y cuantificar la actividad de la enzima (número de fosfatos que adhiere la enzima a un sustrato conocido) [6]. Sin embargo, a pesar de ser técnicas efectivas en la detección, identificación y caracterización de la fosforilación de proteínas, algunas de sus principales desventajas son: La mayoría de las veces es necesario conocer la identidad de la proteína de interés para plantear la hipótesis o utilizar una batería de anticuerpos para encontrar un patrón de expresión; comprar o mandar a fabricar el o los fosfo-anticuerpos; las reacciones cruzadas y la especificidad de los anticuerpos; la reproducibilidad de los experimentos utilizando estas técnicas; la cantidad de desechos que se generan por cualquiera de estos análisis (geles, tubos, soluciones, material contaminado, etc.); los tiempos experimentales y de análisis son generalmente largos (semanas); se requiere excesiva preparación de la muestra para poder obtener resultados (incubaciones muy largas con anticuerpos, depleción de glucosa o ATP para incorporar al radioisotopo, marcaje toda la noche para incorporación del Fósforo inorgánico, etc.); los resultados generalmente nos dan una idea de los sitios que se encuentran fosforilados, pero no podemos asegurarlo o confirmarlo fácil y económicamente.

Hoy en día, gracias al uso de la Espectrometría de Masas podemos determinar los sitios de fosforilación de una proteína de una manera más eficiente y reproducible, evitando las reacciones cruzadas de los anticuerpos, con menor preparación de la muestra. Tomando ventaja de los equipos de triple cuadrupolo, y la versatilidad de los análisis que ofrecen, podemos en una sola corrida detectar múltiples sitios de fosforilación en un péptido, y determinar que aminoácido es el que sufre la fosforilación. Además, de poder identificar y analizar otros tipos de PTM's en la misma proteína con un mínimo consumo de la muestra.

El procedimiento normal para la identificación de proteínas por estos equipos involucra la separación de la proteína, comúnmente por electroforesis en geles o por cromatografía líquida o de capa fina. Posteriormente, se realiza el análisis e identificación de la proteína intacta o una mezcla de péptidos proteolíticos (provenientes de un tratamiento previo con una enzima, como la tripsina). En este paso se puede incluir la caracterización de PTMs, por espectrometría de masas sencillo (MS) o espectrometría de masas en tándem (MS/MS) [6-9]. Regularmente, se requiere de un paso extra para el análisis de PTM's debido a su baja frecuencia y estequiometría en relación con los péptidos no-modificados (aproximadamente del 1-2% de la proteína no-fosforilada); este se conoce como enriquecimiento de la muestra. Hasta la fecha se han descrito varias estrategias de enriquecimiento: procedimientos de modificación química, fosfoamida, inmunoprecipitación por anticuerpos fosfo-específicos, purificación por afinidad a metales (IMAC, immobilized metal-ion affinity chromatography), interacción ácido-base con TiO_2 (Dióxido de Titanio), enriquecimiento en solución por cromatografía de intercambio catiónico fuerte (SCX, Strong cation exchange), o combinaciones de estos métodos [para revisión 5,6].

Para la identificación de un sitio fosforilado por un equipo de triple cuadrupolo es necesario conocer que la unión de un grupo fosfato se reflejara en un incremento en la masa del péptido en +80 Da (o m/z), lo cual podría ser el caso más sencillo, y se puede detectar por un análisis MS sencillo [5-9]. La gran ventaja de utilizar al espectrómetro de masas para estos análisis, es que no solo identifica al péptido fosforilado, sino que gracias a sus algoritmos y variedad de escaneos se puede seleccionar a este péptido para su fragmentación y conocer su secuencia y el aminoácido fosforilado. En referencia a su caracterización es necesario realizar análisis MS/MS y existen varios escenarios: primero, detectarlo por un incremento de masa por la fosforilación más estable, la fosfotirosina (pTyr). En este caso, al someter la proteína a MS/MS se le puede pedir al instrumento que busque al fragmento que perdió 216 m/z para la pTyr (Precursor Ion Scan). Segundo, una fosforilación poco estable como la fosfoserina (pSer) y fosfotreonina (pThr). Para este caso, cuando los péptidos son fragmentados por disociación inducida por colisión (CID) en modo positivo, ocurre la pérdida neutra (Neutral Loss Scan) predominante de ácido fosfórico (-98 m/z , $-\text{H}_3\text{PO}_4$) que produce un pico característico de las proteínas fosforiladas en pSer o pThr en los espectros MS/MS. En la actualidad los equipos de espectrometría de masas cuentan con otros tipos de análisis para la identificación y determinación de la fosforilación. Por ejemplo, utilizar polaridad negativa buscando mediante un Product Ion Scan de relación masa-carga 79 en modo MS/MS, o en los equipos que poseen una trampa de iones lineal (QTRAP® Technology) pueden realizar un paso extra de fragmentación (MS/MS/MS) [5-9].

En el presente trabajo [9], se utiliza a la espectrometría de masas como herramienta para la identificación y cuantificación de la proteína Focal Adhesion Kinase (FAK), así como la confirmación de los sitios de fosforilación en su secuencia utilizando un equipo 4000 QTRAP® LC/MS/MS (AB SCIEX). Mediante técnicas bioquímicas y moleculares, se han determinado en esta cinasa once Serinas y seis Tirosinas que juegan un papel importante en el control de su señalización y actividad [9]. FAK, miembro de la familia de cinasas de tirosina de c-Src, está involucrada en el crecimiento celular, migración y diferenciación en múltiples sistemas de señalización celular. En el presente trabajo, además se utilizó herramientas de software como Multiple Reaction Monitoring (MRM) Initiated Detection And Sequencing Strategy (MIDAS™ Workflow) y el software ProteinPilot™ para la identificación y búsqueda en las bases de datos (SwissProt uniprot_sprot20051220.fasta). Estos softwares ayudaron en monitorear, identificar y caracterizar los 29 péptidos provenientes del digerido de la cinasa FAK, los cuales contienen los sitios de fosforilación reportados, así como, otros sitios putativos de ser fosforilados. El objetivo de este estudio es evaluar los sitios de autofosforilación de la cinasa, así como los sitios que son fosforilados por la cinasa c-Src para la activación de FAK *in vitro*. La forma de evaluar los sitios fosforilados por c-Src fue realizando un ensayo de fosforilación incubando a FAK o ambas cinasas en un buffer de reacción en presencia o ausencia de ATP a diferentes temperaturas. Los tiempos de retención y transiciones MRM de los 29 péptidos fueron determinados por el software MIDAS™ Workflow basado en experimentos realizados en condiciones de Nano-flujo (200 nL/min) de full scan (MS) y Precursor Ion Scan (MS/MS) para fosforilación (-79 m/z) y la fosfotirosina (Δ 216 m/z). Los métodos creados por el MIDAS™ utilizan el algoritmo Information Dependent Acquisition (IDA) del software Analyst® del espectrometro de masas, para automatizar el proceso. El IDA,

se programó para realizar un MRM como Survey Scan, seguido de un Enhanced Resolution scan (ER) para determinar la carga del péptido, con las siguientes condiciones de aceptación para los escaneos Enhanced Product Ion (EPI) para elucidar su secuencia: umbral de 1000 cuentas por segundo (cps), CID con Rolling collision energy, ajustando el rango de masas del cuadrupolo 1 (Q1) para seleccionar el ion paterno con mayor intensidad, y el rango de masa para el cuadrupolo 3 (Q3) para monitorear el ion producto más intenso. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

El análisis LC/MS/MS del digerido de FAK en ambos escaneos buscando sitios fosforilados (Precursor Ion scan para m/z 216 [pY] y m/z -79 [pS, pT, pY]) identificó del total de 29 péptidos, once fosforilados que contienen diecisiete diferentes sitios fosforilados.

De acuerdo a reportes previos, el sitio principal de fosforilación por Src en FAK es la tirosina 861. El fragmento que contiene este sitio de la digestión de FAK es un péptido largo del aminoácido 842 al 874 [GS⁸⁴³IDREDGS⁸⁵⁰LQGPIGNQH⁸⁶¹QPVGKPDPAAPPK] y se pudo observar en 6 estados diferentes de fosforilación: desfosforilado con tiempo de retención de 20.1 min, mono-fosforilados con tiempos de retención 19.1 min [pY⁸⁶¹] y 21.1 min [pS⁸⁴³], bi-fosforilados con tiempos de retención 17.9 min [pS⁸⁴³pS⁸⁵⁰] y 20.3 min [pS⁸⁴³pY⁸⁶¹], y tri-fosforilado con tiempo de retención de 17.2 min [pS⁸⁴³, pS⁸⁵⁰pY⁸⁶¹]. Para evaluar el patrón de fosforilación de este fragmento, se plantearon 4 condiciones de análisis. Condición 1: Incubación de FAK en presencia de ATP a 4°C, condición 2: Incubación de FAK en presencia de ATP a 37°C, condición 3: Incubación de FAK en presencia de Src y ATP a 4°C, condición 4: Incubación de FAK en presencia de Src y ATP a 37°C. Los resultados sugieren que no hay modificación del patrón de fosforilación en las condiciones experimentales 1, 2 y 3. Sin embargo, se observa que bajo la condición experimental 4, existe un notable incremento en la especie mono-fosforilada (pY⁸⁶¹) y tri-fosforilada (pS⁸⁴³, pS⁸⁵⁰, pY⁸⁶¹). Estos resultados confirman que la tirosina 861 es fosforilada por Src en condiciones de activación, incrementando la especie mono-fosforilada [pY⁸⁶¹]. Sin embargo, los resultados también sugieren que la presencia de dos residuos fosforilados en Serina dentro de este péptido, llevan a un incremento en el nivel de fosforilación del residuo pY⁸⁶¹, comparado con las diferentes especies fosforiladas.

En conclusión, la espectrometría de masas para el análisis de proteínas y péptidos fosforilados es una herramienta poderosa determinando cualitativamente y cuantitativamente la fosforilación en uno o múltiples residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína. Mediante el uso de distintos escaneos, softwares y separaciones utilizando flujos en nanolitros, esta herramienta puede ser un gran aliado en la elucidación de rutas de transducción de señales, seguimiento en los niveles de fosforilación bajo diferentes condiciones de análisis, la identificación y confirmación de proteínas en las bases de datos, y el análisis de múltiples sitios de fosforilación en un solo experimento.

Bibliografía

1. Schweiger R, Linial M (2010) "Cooperativity within proximal phosphorylation sites is revealed from large-scale proteomics data" *Biology Direct* **5**: 6.
2. Wilkins MR, Gasteiger E, Gooley AA, Herbert BR, Molloy MP, Binz PA, Ou K, Sanchez JC, Bairoch A, Williams KL, Hochstrasser DF (1999) "High-throughput mass spectrometric Discovery of proteína post-translational modifications" *J Mol Biol* **289** (3): 645-57.
3. <http://www.abrf.org>
4. Mann M, Jensen ON (2003) "Proteomics análisis of post-translational modifications" *Nat Biotechnol* **21** (3): 255-261
5. Teporini C, Calleri E, Massolini G, Caccialanza G (2008) "Integrated analytical strategies for the study of phosphorylation and glycosylation in proteins" *Mass Spectrometry Reviews* **27**: 207-236.
6. Salih E (2005) "Phosphoproteomics by mass spectrometry and classical protein chemistry approaches" *Mass Spectrometry Reviews* **24**: 828-846
7. "Automated identification and sequencing of Post-Translational modifications using PTM discovery on the 4000 Q TRAP[®] LC/MS/MS system" (2004) *Application Note AB SCIEX* **114AP36-01**.
8. Matsubara Mamoru, Hunter Christie, Tsuchiya Fumihiko (2006) "Dynamic site-specific phosphorylation analysis of signal transduction pathways. iTRAQ[™] reagent quantification on the 4000 Q TRAP[®] system" *Technical Note AB SCIEX* **114TN36-01**.
9. Ciccimaro Eugene, Hevko John, Blair Ian A (2007) "Targeted identification and quantitative monitoring of phosphorylation changes of focal adhesion kinase protein. MIDAS[™] workflow for phosphorylation studies using the 4000 Q TRAP[®] system" *Technical Note AB SCIEX* **114TN37-01**.

Análisis de proteínas por *western blot*

M. en C. Enrique Santos

Accesolab



La técnica de Western blot (alternativamente llamada inmunoblot) es una técnica analítica que se utiliza para detectar proteínas específicas en una mezcla muy compleja de proteínas. Estas proteínas pueden provenir de muestras de tejido, cultivos celulares o extractos celulares. Para realizar la técnica, las proteínas son, primeramente, separadas en un gel de arcilamida en condiciones desnaturalizantes (por su peso molecular) o en condiciones nativas (por su estructura). Luego, las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF, donde se utilizara un anticuerpo o anticuerpos específicos para una o más proteínas, las cuales, en caso de estar presentes, serán detectadas.

Como resultado de esta técnica, es posible identificar la presencia o ausencia de una o varias proteínas al compararse diferentes condiciones celulares o de enfermedad, e incluso, comparar si existe una diversidad en cantidades de una misma proteína en diferentes condiciones de experimentación.

Actualmente, esta técnica esta teniendo diversos desarrollos que la hacen más reproducible y permiten obtener mayor cantidad de información en un solo experimento. Para lograr lo anterior, se hace usos de sistemas de documentación que nos permiten detectar diferentes técnicas de revelado, como es el caso de Radioactividad, Fluorescencia y quimiofluorescencia. Estos sistemas son, por lo regular, escáneres de cama plana, como es el caso de los sistemas Typhoon y Storm.

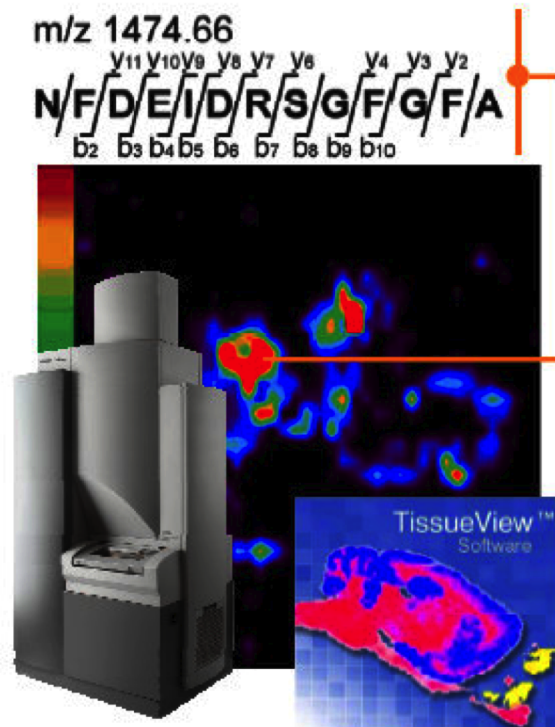
Mass Spectrometry Imaging (MSI) para análisis moleculares en tejidos: Proteínas y Lípidos

Resumen

La espectrometría de masas (MS) durante los últimos años ha ganado un gran interés en ciencias como la Proteómica, Lipidómica, Metabolómica, Farmacología, Toxicología, Ciencias Forenses, etc., debido a su gran versatilidad en los análisis, tiempos reducidos de preparación de la muestra, automatización y la gran cantidad de información que se puede obtener con una mínima cantidad de muestra (volumen o concentración). Hasta el momento, podemos encontrar una gran variedad de espectrómetros de masas en el mercado. Entre los más versátiles están, los instrumentos que utilizan ionización por MALDI (Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization) acoplado a analizadores de doble Tiempo de Vuelo (TOF-TOF "Time-Of-Flight") [MALDI TOF-TOF], ya que ofrecen estas grandes ventajas, manteniendo una mínima preparación de muestra. Los equipos entregan gran cantidad de información y permiten analizar una gran cantidad de muestras en tiempos reducidos, con robustez, reproducibilidad y facilidad de uso. Además, este tipo de equipos permiten hacer análisis de mezclas complejas, permitiendo la identificación, elucidación, secuenciación y en muchos casos cuantificación, de muestras peptídicas, proteicas, de fármacos, de metabolitos, de tóxicos, etc. [1].

Recientemente, científicos como el Dr. Richard Caprioli y otros grupos de investigación, han empleado la ionización MALDI para desarrollar una nueva técnica de análisis por espectrometría de masas directamente sobre el tejido de interés (Mass Spectrometry Imaging, MSI) y obtener como resultado un mapa molecular de alta resolución de la localización y distribución de una gran cantidad de compuestos directamente sobre el tejido, órgano o animal completo, en una sola adquisición. [1-5]. Esta técnica puede ser utilizada como una herramienta de descubrimiento para entender la expresión y localización de las diversas especies moleculares, por ejemplo en biopsias provenientes de tejidos sanos contra tejidos enfermos, en el diagnóstico y prognosis de enfermedades como el cáncer, la distribución de un fármaco y sus metabolitos en el tejido, etc. [2, 6].

En los experimentos de imaging, las biopsias de tejidos deben ser congeladas inmediatamente después de su adquisición en nitrógeno líquido o isopentano para minimizar la degradación de proteínas y preservar la morfología de la muestra. Para la mayoría de las aplicaciones, se generan cortes con un grosor entre 5 a 20 μm y se colocan sobre una placa conductiva. La deposición de la matriz juega un papel muy importante para preservar las especies moleculares intactas y tener resultados reproducibles. La matriz puede ser depositada como gotas de alta densidad o en spray ("spotted") o en forma de un recubrimiento homogéneo sobre la sección del tejido ("coated"). Las técnicas de deposición de matriz pueden variar dependiendo de las condiciones del experimento, puede ser una deposición manual, asistida por un robot (por impresión, por electrospay o por asistencia neumática), o la deposición de gotas de matriz sobre el tejido. Los datos por espectrometría de masas son adquiridos en un patrón de cuadrícula, con un número predeterminado de disparos de láser por coordenada en la cuadrícula.



Éste patrón tiene una distancia fija entre los disparos del láser, típicamente, de 50 a 300 μm dependiendo de las dimensiones del tejido y la resolución requerida de la imagen. La adquisición de los datos y su procesamiento se llevan a cabo de manera automática y por algoritmos especializados. Por último, el procesamiento de los datos involucra la reconstrucción de la imagen y la integración de las intensidades de las señales preprocesadas para los valores m/z , para cada pixel, a lo largo de todos los datos obtenidos. Desde esta perspectiva, un solo experimento de Imaging, podría generar literalmente cientos de mapas o imágenes mostrando densidades específicas para cada especie molecular. Este es uno de los principales motivos de utilizar softwares que tengan capacidades de análisis estadísticos para poder observar las diferencias en los experimentos [2].

En este estudio [7], se hace uso del analizador de la compañía AB SCIEX el 4800 *plus* MALDI TOF/TOF™ por sus características de alta sensibilidad, resolución, exactitud de masa y su capacidad de realizar análisis en modo MS (TOF sencillo) y MS/MS (TOF-TOF).

Se tomaron secciones del tejido cerebral de rata y se realizó en la mitad del tejido una digestión con tripsina *in situ*, seguido de la aplicación de la matriz CHCA (a-cyano-hydroxycinnamic acid, 6mg/mL) en todo el tejido, para someterlo a los análisis en modos MS y MS/MS. Además, tomando ventajas del software de análisis por Imaging (TissueView™ 1.0) se seleccionaron diferentes regiones de interés (ROI) para hacer los análisis comparativos de la localización de especies moleculares en ambas partes del tejido. El análisis de los resultados mostró en la mitad digerida con tripsina del cerebro de rata, un ion de interés ($m/z = 2141.2$) que mostró una localización particular en el tejido. En un experimento posterior se realizó la fragmentación de este precursor (MS/MS) para su identificación. Como era de esperarse el fragmento mayoritario (1797.2) del ion precursor 2141.2, muestra la misma localización dentro del tejido, confirmando el experimento. Posteriormente, mediante el software TissueView™, se seleccionó el ROI donde la intensidad del ion fue mayoritaria para poder obtener un promedio de los espectros MS/MS para este precursor. A este promedio MS/MS (relación masa-carga contra intensidad) se le realizó una búsqueda en la base de datos de MASCOT® para la identificación de la proteína. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de la proteína Mielínica Básica (MBP), abundante en tejido cerebral y nervioso, por la presencia de la secuencia TQDENPVVHFFKNIIVTPR. Al observar los espectros MS/MS obtenidos y compararlos con los reportados en la base de datos para este fragmento, se puede ver la identificación de la mayoría de los iones-*y* y algunos de los iones-*b* provenientes del análisis, confirmando el resultado.

En conclusión, al utilizar Mass Spectrometry Imaging y un equipo de alta resolución como el 4800 *plus* MALDI TOF/TOF™, podemos realizar búsquedas e identificaciones directamente sobre el tejido de las especies moleculares presentes, obteniendo resultados altamente confiables, reproducibles y con el mínimo de tratamiento de muestra. Además, con el uso de herramientas como el software TissueView™ podemos realizar los análisis de resultados de una manera rápida, sencilla y altamente confiable.

Bibliografía

1. Benabdellah F, Touboul D, Brunelle A, Laprévotte O (2009) "In situ primary metabolites localization on a rat brain section by Chemicals Mass Spectrometry Imaging" *Analytical Chemistry* **81** (13); 5557-5560].
2. Chaurand P, Norris JL, Cornett DS, Mobley JA, Caprioli RM (2006) "New developments in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI Mass Spectrometry" *Journal of Proteome Research* **5** (11); 2889-900
3. Lemaire R, Desmons A, Tabet JC, Day R, Salzet M, Fournier I (2007) "Direct analysis and MALDI Imaging of formalin-fixed, Paraffin-Embedded tissue sections" *Journal of Proteome Research* **6**; 1295-1305
4. Leinweber BD, Tsapraillis G, Monks TJ, Lau SS (2009) "Improved MALDI-TOF Imaging yields increased protein signals at high molecular mass" *Journal American Society of Mass Spectrometry* **20** (1); 89-95
5. Chen R, Hui L, Sturm RM, Li L (2009) "Three Dimensional Mapping of neuropeptides and lipids in crustacean brain by mass spectral imaging" *Journal American Society of Mass Spectrometry* **20**; 1068-1077
6. Pribil Patrick, Shahidi-Latham Sheerin (2010) "Identification and distribution of a reserpine metabolite in whole-body rat tissue using MS and MS/MS mass spectrometric imaging. High Confidence Imaging using the AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 System" *Technical Note AB SCIEX* **114TN73-01**.
7. Pribil Patrick (2008) "Sequence identification and spatial distribution of rat brain tryptic peptides using MALDI mass spectrometric imaging. 4800 *plus* MALDI TOF/TOF™ Analyzer" *Technical Note AB SCIEX* **115TN15-01**.

Mensaje Bioquímico

La presente obra se terminó de imprimir el 3 de julio de 2010 en el Departamento de Impresos de la Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Interior de la Ciudad Universitaria, México D. F. 04510. En su composición se utilizaron fuentes Sans-serif/Arial 9, 10, 12 y 14. La impresión se hizo en papel Bond de 75 g/m² con pasta blanda. Su tiraje consta de 250 ejemplares más sobrantes para reposición.

PORTADA

Torre de la Rectoría, Ciudad Universitaria,
Universidad Nacional Autónoma de México.
Foto: Ismael Bustos Jaimes

DISEÑO

Ismael Bustos Jaimes