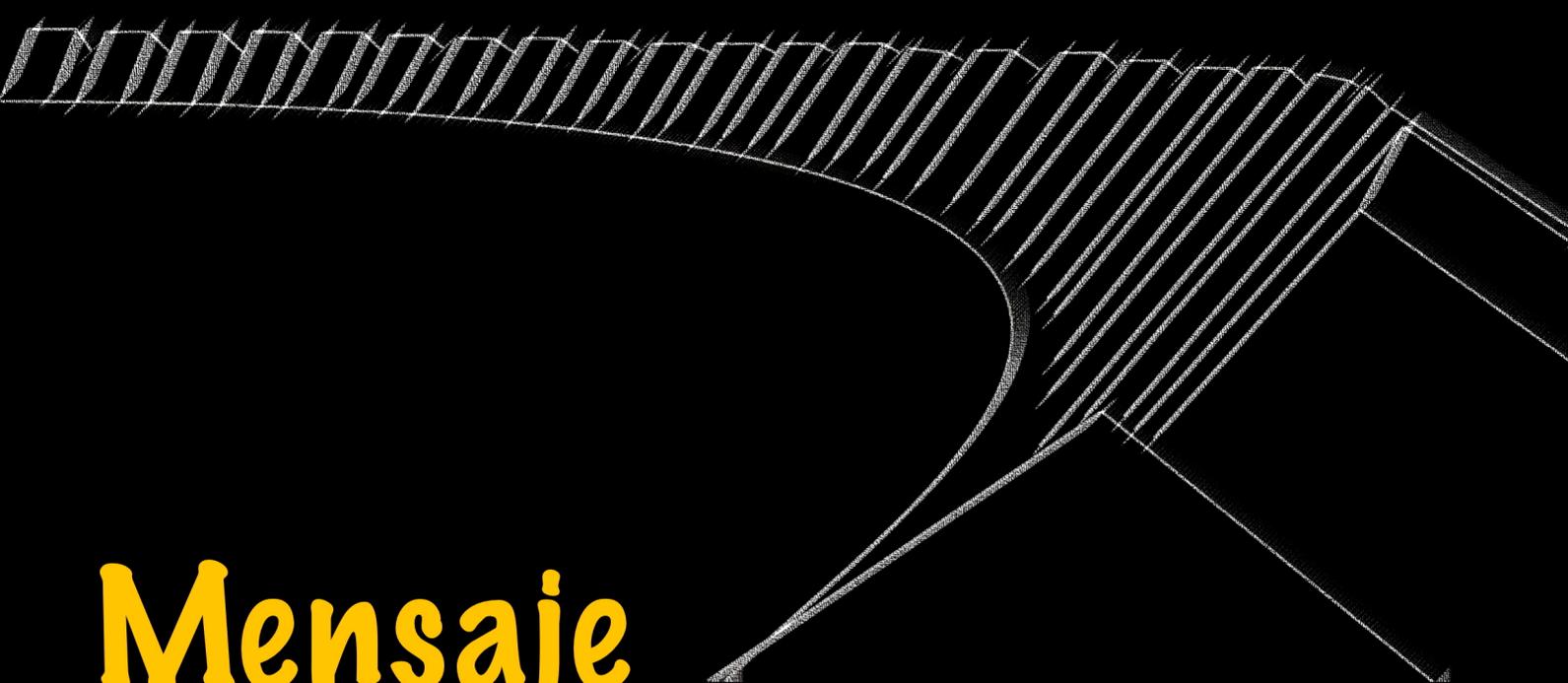




Facultad de Medicina, UNAM
Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina



Mensaje Bioquímico

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

Vol. XXXV, 2011

ISSN 0188-137N

MENSAJE BIOQUÍMICO

EDITORES:

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

ORGANIZADO POR:

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

VOL. XXXV

2011

7 de junio de 2011 a 4 de junio de 2012

ÍNDICE

Editorial	VII
Agradecimientos	IX
Programa	X
Los inicios de la química moderna en las ciencias químicas y biológicas en México Patricia Aceves Pastrana	XV
Factores inmunológicos que participan en la progresión de la tuberculosis pulmonar Rogelio Hernández Pando, Dulce Mata, Diana Aguilar y Héctor Orozco	1
Estructuras virales en la nanomedicina Lorena P. Sánchez-Sánchez y Rafael Vazquez-Duhalt	17
Duplicación génica: implicaciones bioquímicas, fisiológicas y evolutivas en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Alicia González Manjarrez	27
Estructura y regulación del nanomotor que le da energía a la vida: la F1F0-ATP sintasa José J. García Trejo, Mariel Zarco Zavala y Edgar Morales Ríos	39
El paisaje conformacional de un dominio de inmunoglobulina explorado con dinámica molecular Nina Pastor Colón y D. Alejandro Fernández Velasco	53
Sistema de incompatibilidad gametofítico en plantas: una oportunidad para evitar la endogamia Beatriz Alejandra Ávila Castañeda, Felipe Cruz García	67
Mecanismos comunes y alternativos de acción de neuromoduladores Jorge Flores Hernández, Oswaldo Torres-Ramírez y Gustavo Lopez-Lopez	79
Investigaciones sobre el ciclo biológico y la transmisión de <i>Pneumocystis</i> (Fungi: Ascomycota) Eduardo Dei-Cas, Ana Martínez, Magali Chabé, El Moukhtar Aliouat, Christine Demanche y Cécile-Marie Aliouat	93

El genoma del mexicano y sus enfermedades Julío Granados Arriola, Alejandra Lara Mejía, Bernardo Moreno Peniche, Yareth Dueñas Andrade y Enrique Caballé Pérez	107
Transporte de ARN en neuronas: el transcriptoma axonal, origen y función José R. Sotelo Silveira y José R. Sotelo Sosa	115
Determinantes moleculares de las neurotoxinas de arácnidos implicados en la unión a los canales de sodio dependientes de voltaje Gerardo Corzo	131
Estructuras tridimensionales in silico a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína ¿Cómo saber que el modelo es realista? Rogelio Rodríguez-Sotres, Samantha A. Gaytán-Mondragón, Eric E. Hernández-Domínguez y Lilian G. Valencia Turcotte	143
Anexo. Nuevos enfoques metodológicos	157
Aplicaciones de resonancia magnética nuclear en el estudio de proteínas Carlos Amero	159
Genómica y proteómica funcional, una nueva forma de ver las cosas Enrique Santos Esteban	173
Principios y aplicaciones del RNA de interferencia Laura Alejos Velázquez	175
El uso del multiplexing como herramienta en el análisis de proteínas Samuel García Nieto	177
<i>Espectrometría de masas: una herramienta esencial para la identificación y caracterización de biomarcadores</i> Deckar Rojas Saiz	179
Odyssey® Infrared Imaging System	181

Mensaje Bioquímico Vol. XXXV

D.R. © 2011 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, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXXV, 2011**. 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 se ha caracterizado, desde su fundación, por fomentar los principios de autonomía universitaria, libertad de pensamiento y libertad de cátedra, lo que le ha permitido ser líder en el desarrollo y difusión de las artes, el deporte y las ciencias. Estas características le han valido reconocimiento a nivel nacional e internacional y ha creado un compromiso entre la comunidad universitaria y la sociedad, para seguir desarrollando los conceptos mencionados y demostrar que la autonomía de la máxima casa de estudios de nuestro país es el impulso que permite ejercer su papel como núcleo de progreso.

Un área del conocimiento que tiene un gran desarrollo dentro de la UNAM es la Química y este año la Asamblea General de la ONU declaró al 2011 como el año internacional de la Química para concientizar al público en general sobre la importancia que tiene esta ciencia sobre el bienestar de la humanidad. Este año también coincide con el centenario de la entrega del premio Nobel a Marie Curie, por sus aportes a la química, y con la primera reunión de la Asociación Internacional de Sociedades Químicas, que posteriormente se convirtió en la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). La conmemoración enfatiza la contribución de la Química como ciencia creativa esencial para mejorar la sostenibilidad de nuestros modos de vida y para resolver los problemas globales y esenciales de la humanidad, como la alimentación, el agua, la salud, la energía o el transporte.

Por este motivo la UNAM ha desarrollado varias actividades para conmemorar este acontecimiento y, siguiendo en la misma temática, el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, a través del Taller de Actualización Bioquímica en su edición número XXXVIII, ha hecho énfasis en la química sin descuidar el aspecto primordial del Taller, que es la difusión de la bioquímica.

Los trabajos que se presentan en este Taller están plasmados en la revista *Mensaje Bioquímico* en su edición XXXV. Este año contamos con la participación de investigadores de reconocimiento nacional e internacional que trabajan en áreas de gran importancia científica.

Para iniciar, el **Dr. Gerardo Corzo** del Instituto de Biotecnología nos habla sobre los determinantes moleculares de las neurotoxinas de arácnidos que participan en la unión a los canales de sodio dependientes de voltaje. En el terreno de las plantas, el **Dr. Felipe Cruz García** de la Facultad de Química nos presenta su trabajo sobre un sistema de incompatibilidad gametofítico que evita la endogamia y promueve la diversidad genética.

Este año contamos con la presencia de dos investigadores de provenientes del extranjero. El **Dr. Eduardo Dei-Cas**, del Instituto Pasteur, Francia, presenta su trabajo sobre el ciclo biológico y la transmisión de *Pneumocystis* en pacientes con bajos niveles de protección inmunológica, en especial en enfermos del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA); mientras que el **Dr. José Roberto Sotelo Silveira**, perteneciente al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente

Estable, de Montevideo, Uruguay, nos habla sobre el transporte de ARN en neuronas, particularmente del transcriptoma axonal.

El **Dr. Jorge Flores** del Instituto de Fisiología de la BUAP nos habla sobre los conocimientos que se tienen sobre los mecanismos de acción de neuromoduladores. Por su parte, la **Dra. Alicia González Manjarrez** del Instituto de Fisiología Celular nos presenta su trabajo titulado "Duplicación génica: implicaciones bioquímicas, fisiológicas y evolutivas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*". Del mismo modo, el **Dr. Julio Granados Arriola** del INCMN "Salvador Zubirán", presenta sus investigaciones sobre el genoma del mexicano y la relación que hay con respecto a algunas enfermedades. Asimismo, el **Dr. Rogelio Hernández Pando**, perteneciente al mismo instituto, expone su trabajo sobre los factores inmunológicos que participan en la progresión de la tuberculosis pulmonar.

En temas relacionados con estructura de proteínas, la **Dra. Nina Pastor Colón** de la Facultad de Ciencias de la UAEM y el **Dr. Rogelio Rodríguez Sotres** de la Facultad de Química de la UNAM, nos presentarán estudios *in silico* sobre estas moléculas. La **Dra. Pastor** se enfoca en explicar el paisaje conformacional de un dominio de inmunoglobulina explorado con dinámica molecular, mientras que el **Dr. Rodríguez** nos instruye sobre el control de calidad de los modelos tridimensionales generados *in silico* a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína. Además, el **Dr. José de Jesús García Trejo** de la Facultad de Química de la UNAM presentará un panorama general del conocimiento actualizado sobre la estructura y regulación de la F_1F_0 -ATP sintasa. Por su parte, el **Dr. Rafael Vázquez Duhalt** del Instituto de Biotecnología de la UNAM nos presenta un trabajo de gran interés sobre las estructuras virales y cómo éstas pueden utilizarse en nanomedicina.

Finalmente, y tomando en cuenta el interés general sobre los enfoques metodológicos presentados en la edición anterior del TAB, este año se volvió a invitar a diferentes compañías a que nos presenten las técnicas y equipo de vanguardia para desentrañar los misterios de la bioquímica.

Para iniciar esta sección, el **Dr. Carlos Amero** del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM nos ilustra sobre las aplicaciones de la resonancia magnética nuclear en el estudio de proteínas. La compañía **Accesolab** nos presenta una charla sobre genómica y proteómica funcionales, así como una charla sobre los principios y usos del RNA de interferencia. **Merck-Millipore** nos presenta una plática sobre el uso del multiplexing para el análisis de proteínas.

Contamos con la presencia de **Química Valaner**, que presenta el sistema de documentación Odyssey®. Por último, la empresa **AB Sciex** nos presenta una charla sobre la espectrometría de masas como herramienta fundamental en la identificación y caracterización de biomarcadores.

Héctor Vázquez Meza
Junio, 2010

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer el apoyo del **Dr. Enrique Luis Graue Wiechers**, Director de la Facultad de Medicina de la UNAM, y del **Dr. Edgar Zenteno Galindo**, Jefe del Departamento de Bioquímica de esta misma Facultad. De manera especial, agradecemos 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 quinto año consecutivo el Taller de Actualización Bioquímica. Al mismo tiempo agradecemos el apoyo logístico del **Maestro Gerardo Hierro Molina**, Secretario de Asuntos Estudiantiles, Culturales y Deportivos de la Facultad de Derecho, por las facilidades otorgadas para 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**.

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: **ABSCIEX, ACCESOLAB, ASPELAB, MERCK-MILLIPORE, QUÍMICA VALANER** y **UNIPARTS**, quienes han brindado su apoyo para el desarrollo de el Taller de Actualización Bioquímica.

XXXVIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 1 al 3 de agosto de 2011

9:00-10:00	Dr. Rogelio Hernández Pando Depto. de Patología, INCMNSZ <i>Factores inmunológicos que participan en la progresión de la tuberculosis pulmonar</i>	Dr. José de Jesús García Trejo Facultad de Química, UNAM <i>Estructura y regulación del nanomotor que le da energía a la vida: la F1F0-ATP sintasa</i>	Dr. Julio Granados Arriola Depto. de Trasplantes. INCMNSZ <i>El genoma del mexicano y sus enfermedades</i>
10:00-11:00	Dra. Patricia Aceves Pastrana UAM-Xochimilco <i>Los inicios de la química moderna en las ciencias químicas y biológicas en México</i>	Dra. Nina Pastor Colón Facultad de Ciencias, UAEM <i>El paisaje conformacional de un dominio de inmunoglobulina explorado con dinámica molecular</i>	Dr. José R. Sotelo Silveira Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay <i>Transporte de ARN en neuronas: el transcriptoma axonal, origen y función</i>
11:00-11:30	Receso		
11:30-12:30	Dr. Rafael Vázquez Duhalt Instituto de Biotecnología, UNAM <i>Estructuras virales en la nanomedicina</i>	Dr. Felipe Cruz García Facultad de Química, UNAM <i>Sistema de incompatibilidad gametofítico en plantas: una oportunidad para evitar la endogamia</i>	Dr. Gerardo Corzo Instituto de Biotecnología, UNAM <i>Determinantes moleculares de las neurotoxinas de arácnidos implicados en la unión a los canales de sodio dependientes de voltaje</i>
12:30-13:30	Dra. Alicia González Manjarrez Instituto de Fisiología Celular, UNAM <i>Duplicación génica: implicaciones bioquímicas, fisiológicas y evolutivas en la levadura Saccharomyces cerevisiae</i>	Dr. Jorge Flores Instituto de Fisiología, BUAP <i>Mecanismos comunes y alternativos de acción de neuromoduladores</i>	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres Facultad de Química, UNAM <i>Estructuras tridimensionales in silico a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína ¿Cómo saber que el modelo es realista?</i>
13:30-15:00	Comida		
15:00-16:00	M. C. Enrique Santos Esteban Accesolab <i>Genómica y proteómica funcional, una nueva forma de ver las cosas</i>	Dr. Eduardo Dei-Cas Instituto Pasteur, Lille, Francia <i>Investigaciones sobre el ciclo biológico y la transmisión de Pneumocystis (Fungi: Ascomycota)</i>	M. C. Jorge Ordóñez López Química Valaner <i>Odyssey® Infrared Imaging System</i>
16:00-17:00	Dr. Carlos Amero Tello Centro de Investigaciones Químicas, UAEM <i>Aplicaciones de resonancia magnética nuclear en el estudio de proteínas</i>	M. C. Laura Alejos Velázquez Accesolab <i>Principios y aplicaciones del RNA de interferencia</i>	Dr. Deckar Rojas Saiz AB SCIEX <i>Espectrometría de masas: una herramienta esencial para la identificación y caracterización de biomarcadores</i>
17:00-18:00	Dr. Samuel García Nieto Merck-Millipore <i>El uso del multiplexing como herramienta en el análisis de proteínas</i>		

XXXVIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 1 al 3 de agosto de 2011

LUNES

8:30 Registro e Inscripciones

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

Conferencias:

9:00-10:00

Dr. Rogelio Hernández Pando

Depto. de Patología, INCMNSZ

"Factores inmunológicos que participan en la progresión de la tuberculosis pulmonar"

10:00-11:00

Dra. Patricia Aceves Pastrana

UAM-Xochimilco

"Los inicios de la química moderna en las ciencias químicas y biológicas en México"

11:30-12:30

Dr. Rafael Vazquez-Duhalt

Instituto de Biotecnología, UNAM

"Estructuras virales en la nanomedicina"

12:30-13:30

Dra. Alicia González Manjarrez

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

"Duplicación génica: implicaciones bioquímicas, fisiológicas y evolutivas en la levadura Saccharomyces cerevisiae"

15:00-16:00

M. en C. Enrique Santos Esteban

Accesolab

"Genómica y proteómica funcional, una nueva forma de ver las cosas"

16:00-17:00

Dr. Carlos Amero

Centro de Investigaciones Químicas, UAEM

"Aplicaciones de resonancia magnética nuclear en el estudio de proteínas"

XXXVIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 1 al 3 de agosto de 2011

MARTES

9:00-10:00

Dr. José de Jesús García Trejo

Facultad de Química, UNAM

"Estructura y regulación del nanomotor que le da energía a la vida: la F1F0-ATP sintasa"

10:00-11:00

Dra. Nina Pastor Colón

Facultad de Ciencias, UAEM

"El paisaje conformacional de un dominio de inmunoglobulina explorado con dinámica molecular"

11:30-12:30

Dr. Felipe Cruz García

Facultad de Química, UNAM

"Sistema de incompatibilidad gametofítico en plantas: una oportunidad para evitar la endogamia"

12:30-13:30

Dr. Jorge Flores

Instituto de Fisiología, BUAP

"Mecanismos comunes y alternativos de acción de neuromoduladores"

15:00-16:00

Dr. Eduardo Dei-Cas

Instituto Pasteur, Lille, Francia

"Investigaciones sobre el ciclo biológico y la transmisión de Pneumocystis (Fungi: Ascomycota)"

16:00-17:00

M. en C. Laura Alejos Velázquez

Accesolab

"Principios y aplicaciones del RNA de interferencia"

17:00-18:00

Dr. Samuel García Nieto

Merck-Millipore

"El uso del multiplexing como herramienta en el análisis de proteínas"

XXXVIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 1 al 3 de agosto de 2011

MIÉRCOLES

9:00-10:00

Dr. Julio Granados Arriola

Depto. de Trasplantes. INCMNSZ

"El genoma del mexicano y sus enfermedades"

10:00-11:00

Dr. José R. Sotelo Silveira

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

"Transporte de ARN en neuronas: el transcriptoma axonal, origen y función"

11:30-12:30

Dr. Gerardo Corzo

Instituto de Biotecnología, UNAM

"Determinantes moleculares de las neurotoxinas de arácnidos implicados en la unión a los canales de sodio dependientes de voltaje"

12:30-13:30

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Facultad de Química, UNAM

*"Estructuras tridimensionales in silico a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína
¿Cómo saber que el modelo es realista?"*

15:00-16:00

M. en C. Jorge Ordóñez López

Química Valaner

"Odyssey® Infrared Imaging System"

16:00-17:00

Dr. Deckar Rojas Saiz

AB SCIEX

"Espectrometría de masas: una herramienta esencial para la identificación y caracterización de biomarcadores"

XXXVIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 1 al 3 de agosto de 2011

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

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, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXXV, 2011**. 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, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, XV-XXX. 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 INICIOS DE LA QUÍMICA MODERNA EN LAS CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS EN MÉXICO

THE BEGINNINGS OF THE MODERN CHEMISTRY IN MEXICO'S CHEMICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES

Patricia Aceves Pastrana

Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, CP 04960, México DF
paceves@correo.xoc.uam.mx

Resumen

Este artículo analiza las características generales de los inicios de la química moderna en la Nueva España en dos instituciones académicas de corte moderno: el Real Jardín Botánico y el Real Seminario de Minería. Se discute el proceso de adopción y aplicación de la química de Lavoisier y sus colaboradores, que ocurrió de manera temprana favorecido por factores internos y externos.

Palabras clave: Historia de la química en México, química y farmacia siglo XVIII.

Abstract

"This article analyzes the general characteristics of the beginnings of modern chemistry in New Spain in two academic institutions of modern type: the Real Jardín Botánico and the Real Seminario de Minería. It discusses the early process of assimilation and implementation of Lavoisier's and his colleagues chemistry. A phenomenon driven both by internal and external factors"

Key words: History of Chemistry in Mexico, Chemistry and Pharmacy in the Eighteenth Century.

Introducción

En este año, la comunidad científica celebra “El Año Internacional de la Química”. Para unirnos al festejo, la presente comunicación tiene como propósito presentar los rasgos principales de los inicios de la química moderna en México en el terreno de las ciencias químicas y biológicas. Nuestra exposición se centra en dos acontecimientos relevantes para el tema. El primero es la fundación de la Cátedra de Botánica en 1788, donde se inicia la enseñanza de los sistemas de Linneo en botánica y de Lavoisier en química. El segundo, es la apertura de la Cátedra de Química en el Real Seminario de Minería, espacio en el que se adopta el sistema teórico práctico de la química moderna, y para la cual se edita como libro texto, en 1797, la primera traducción al castellano del *Tratado Elemental de Química* de A. L. Lavoisier, obra publicada en francés en 1789.¹

Para el caso que analizaremos a continuación veremos que la adopción y aplicación de los postulados de Lavoisier y colaboradores en la Nueva España a finales del siglo XVIII ocurrió de forma acelerada, catalizada por diversos factores tanto de índole local como provenientes del exterior.

1. En el marco de la Ilustración novohispana y las Reformas Borbónicas

En el siglo XVIII la Nueva España formaba parte de la red científica internacional de información, como lo evidencian tanto los registros de libros, instrumentos y revistas que han llegado hasta nosotros, como la existencia de escuelas, bibliotecas y laboratorios necesarios para desarrollar la actividad científica. Esta comunicación fue favorecida por el intercambio de individuos y de información epistolar, así como por la llegada de expediciones científicas españolas y por la fundación de instituciones académicas de corte moderno.²

En este periodo, las élites ilustradas de la Nueva España, promovieron en todo el territorio el fomento de la educación y de las artes útiles, veían a la ciencia como un medio necesario para la realización de sus proyectos y también como una garantía para asegurar su desenvolvimiento ulterior. El interés por la ciencia y sus aplicaciones útiles en aras del bienestar público, característicos de la Ilustración, fue un rasgo que se mantuvo constante. A este hecho contribuyó una serie de factores geográficos, culturales, económicos, políticos e ideológicos. Como parte de ellos, la bonanza económica proveniente en su gran mayoría del auge minero permitió la explotación de voluminosos caudales de plata, y colocó a este virreinato en el primer lugar de la producción del metal argentífero.³

Junto a estos factores locales, la monarquía ilustrada española aplicó en sus dominios un conjunto de reformas de orden administrativo, social, económico, político y científico tecnológico; tendientes a fortalecer al Estado y subordinar la economía a sus intereses, aún a costa de lesionar los intereses de sus colonias. Como parte de estas medidas se dictaron disposiciones para mejorar la minería, aumentar la explotación de los recursos naturales, superar las lamentables condiciones sanitarias e impulsar la educación en todos sus niveles.

Con estos propósitos se enviaron expediciones científicas y se fundaron establecimientos de enseñanza superior para difundir y aplicar la “nueva ciencia”: la Real Academia de San Carlos en 1781, el Real Jardín Botánico en 1788 y el Real Seminario de Minería en 1792.

¹ Lavoisier, Antoine Laurent (1797) *Tratado Elemental de Química*, Imprenta de Mariano Zúñiga y Ontiveros. Edición facsímil con un “Estudio Preliminar” de Patricia Aceves (1990) Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco, México,

² Aceves, Patricia (1993) *Química, Botánica y Farmacia en la Nueva España a finales del siglo XVIII*, UAM-Xochimilco, México. Trabulsee, Elías (1983) *Historia de la Ciencia en México*, CONACYT/Fondo de Cultura Económica, México.

³ Velasco Ávila, Cuauhtémoc et al. (1988) *Estado y minería en México (1767-1910)*, Fondo de Cultura Económica. México.

2. Química, Botánica y Farmacia en el Real Jardín Botánico

En los siglos XVII y XVIII se publicaron en la Nueva España diversos trabajos que registraron el tesoro medicinal existente en la naturaleza mexicana y trataron de dar una explicación de sus virtudes de acuerdo a los criterios galénicos y a la teoría humoral.^{4,5} Sin embargo, en el siglo XVIII también es aparente en los textos farmacéuticos el empleo de las teorías atomistas y de la iatroquímica, con la subsecuente utilización de los remedios minerales.⁶

El inicio de la Real Expedición Botánica de la Nueva España en 1788, marcó una nueva etapa en la institucionalización de la farmacia y la botánica. Los fines de la expedición contemplaban el estudio y clasificación de las producciones naturales, así como la creación de un jardín y de una cátedra de botánica. Además de los propósitos anteriores, la expedición tenía la encomienda de realizar la reforma del área sanitaria.^{7,8}

La expedición recorrió el territorio mexicano de 1788 a 1803. Siendo el médico Martín Sessé el director de la empresa y el farmacéutico Vicente Cervantes el catedrático de botánica; completaban el contingente el naturalista José Longinos, el farmacéutico Jaime Senseve y el botánico Juan del Castillo. A este grupo de peninsulares se unieron los novohispanos Atanasio Echeverría y Francisco de la Cerda como dibujantes, y posteriormente el médico José Mariano Mociño y el cirujano José Maldonado.⁹ Diversos estudios han remarcado el carácter terapéutico de la empresa española, ya que entre las plantas estudiadas por la expedición predominan las de acción medicinal frente a las que tienen otros usos.¹⁰

Con la apertura del Real Jardín Botánico en 1788, los farmacéuticos novohispanos estuvieron obligados por vez primera a seguir una educación institucional dentro de su Cátedra de Botánica. El curso dictado por el catedrático Vicente Cervantes, abarcaba la enseñanza de los sistemas botánicos de Linneo y Tournefort y de la química moderna, incluido el sistema de Lavoisier y sus colaboradores. La adopción y aplicación de estas concepciones en la terapéutica contribuyeron a la estructuración de nuevas explicaciones en las que paulatinamente fueron desapareciendo las cualidades y los humores.

A pesar de tan loables fines, el comienzo de las actividades de la expedición estuvo ensombrecido por una serie de conflictos entre los criollos y los expedicionarios. Los primeros resintieron la imposición de las medidas elaboradas por la Corona y el no haber sido nombrados como integrantes del Jardín; a ello se sumó el desdén mostrado por los peninsulares hacia la

⁴ López, Gregorio (1674) *Tesoro de las medicinas para diversas enfermedades*, Impreso por Francisco Rodríguez Lupercio mercader de libros en el puente del Palacio, México. Edición facsimilar del IMSS, (1990) México.

⁵ Esteineffer Juan (1712) *Florilegio medicinal de todas las enfermedades*, Herederos de Juan Joseph Guillema/Carrasco en el Empedradillo, México. Edición de Anzures, C. (1978) Academia Nacional de Medicina/Colección la Historia de la Medicina en México, México.

⁶ Beaumont, J. B. (1774) *Tratado de la agua mineral caliente de San Bartolomé*, Imprenta del Br. D. Joseph Antonio de Hogal, México.

⁷ Lozoya Xavier (1984) *Plantas y Luces en México: la real expedición científica a Nueva España (1788-1803)*, SERBAL, Barcelona.

⁸ Aceves, Patricia. (1993) *Química, botánica y farmacia en la Nueva España a finales del siglo XVIII*, Op. Cit. Puerto, Francisco Javier, (1988) *La ilusión quebrada. Botánica, sanidad y política científica en la España Ilustrada*. Serbal/CSIC, Barcelona; (1992) *Ciencia de Cámara. Casimiro Gómez Ortega (1741-1818), el científico cortesano*. CSIC, Madrid

⁹ Zamudio, Graciela (1992) "El Jardín Botánico de la Nueva España y la Institucionalización de la Botánica en México", en Saldaña J.J. ed.) *Los orígenes de la ciencia nacional. Cuadernos de Quipu 4*, SMHCT, México, pp. 55-98.

¹⁰ González Bueno, Antonio, et al. (1991) "Una visión del arsenal terapéutico vegetal desde las farmacopeas españolas, 1739-1954, *Anales de de la Real Academia de Farmacia*", 57.

tradicón botánica local y la amenaza que representaban Sessé y Cervantes para los intereses de la Universidad y el Real Tribunal del Protomedicato, ya que estos últimos pretendían formar parte del Claustro Universitario y habían sido nombrados Alcaldes examinadores del Protomedicato.



Figura 1. Grabado realizado por los dibujantes de la Real Expedición Botánica a Nueva España (1788-1803).

En ese ambiente de descontento y poco antes de la apertura del Jardín, el criollo José Antonio Alzate y Ramírez entabló una polémica en los periódicos de la época con el catedrático de botánica Vicente Cervantes.¹¹ El punto central del debate era el sistema de Linneo, que se utilizaría para la clasificación de las plantas del Jardín. Alzate consideraba que los criterios linneanos no eran útiles para el conocimiento de las virtudes curativas de las plantas. Además, aducía que existían plantas en la Nueva España que no podían ser incluidas en las clases vegetales propuestas por el sueco. Es interesante mencionar que en sus alegatos los contendientes también discutieron acerca de la nueva nomenclatura química.

Alzate se resistía a que gran parte de los conocimientos de esta ciencia fuesen cambiados y desechados. Para dar apoyo a su punto de vista arguyó que la aceptación de la nomenclatura propuesta por los químicos franceses estaba aún en el centro de la discusión y que no existía acuerdo en torno a ella entre los principales químicos de la época. En una carta que Alzate se autodirige bajo el pseudónimo de Pedro el Observador, nos damos cuenta de la rapidez con que

¹¹ José Antonio Alzate y Ramírez (1738-1799), nació en Ozumba en el seno de una familia acomodada, obtuvo en la Real y Pontificia Universidad los grados de Bachiller en Artes y de Bachiller en Teología. Su cultura puede considerarse como enciclopédica. Gozó de gran prestigio en la sociedad de su tiempo por sus proyectos, estudios y publicaciones. Editó varios periódicos de ciencia y cultura. Fue corresponsal de la Real Academia de Ciencias de París y del Real Jardín Botánico de Madrid. Ver Aceves, Patricia ed. (2002) *Periodismo Científico en el Siglo XVIII: José Antonio de Alzate y Ramírez*, tomo 7, Colección *Estudios de Historia Social de las Ciencias Químicas y Biológicas*, UAM, México.

se conocían y discutían en la Nueva España los adelantos más recientes de la ciencia. Aún más, en la mencionada misiva los argumentos de Alzate son semejantes a los presentados por la Comisión de la Academia Real de Ciencias de París que examinó los trabajos de Lavoisier leídos el 17 de abril de 1787.

Muy señor mío: en el pretendido Siglo de las luces, título del que se reirán los sabios e los venideros tiempos, ¿Se intenta ofuscar y enlabyrinthar el camino seguro para aprender las ciencias naturales? Sí señor. Al leer tanta nueva nomenclatura, tanta perturbación en la nociones recibidas, ¿se puede juzgar de otra manera? Ya la química se nos presente bajo el aspecto de voces desconocidas...

*Ya habrá Ud. Visto la nueva nomenclatura química. ¡Qué trastorno! ¡Qué nuevo trabajo y muy reduplicado a los que intentan cultivar esta bella ciencia? ¿Qué hacemos con las obras de Stales y Boheraves y de otros muchos a cuyas fatigas, a cuyos descubrimientos debemos las verdades químicas de que nos gloriamos?*¹²

Al calor de la polémica, Alzate también hizo referencia a dos autores franceses oponentes acérrimos de las teorías de Lavoisier y sus colaboradores, como lo fueron el barón de Marivetz y La Metherie. Este último editor de la revista *Observations sur la Physique*.¹³ Conviene hacer hincapié en que Alzate no aceptaba los sistemas de clasificación de Linneo y Lavoisier por no ser naturales. Pensaba que la complejidad de la naturaleza no podía caber en el marco rígido y formal de los sistemas artificiales como lo eran los ya mencionados; por ello prefirió los sistemas de Tournefort y de Buffon en botánica y de Stalh y Boerhaave en química. Entremezclada con la argumentación científica, Alzate hizo la defensa apasionada de los conocimientos botánicos de los novohispanos y la exaltación de la naturaleza americana.

Durante esta célebre polémica, se escribieron numerosas páginas. Ambos contendientes trajeron a la palestra una serie interminable de autores para apoyar sus puntos de vista y en sus alegatos hicieron gala de su ingenio, entremezclando aspectos de ciencia, ideología y política, aunados a una fuerte dosis de nacionalismo. Sin embargo, poco tiempo después las asperezas se fueron limando, el contingente de la expedición creció cuando se integraron a ella algunos novohispanos y al paso de los años sus miembros se convirtieron en especialistas admiradores de la naturaleza americana. Como ya hemos tratado el tema de la disputa en publicaciones anteriores, sólo remarcaremos que Cervantes y Alzate ocuparon un lugar relevante dentro de la red internacional de comunicación científica en torno a la temprana difusión, adopción y aplicación de la nueva química en la América Española.¹⁴

Un ejemplo de las enseñanzas de química impartidas en el Real Jardín Botánico lo constituyen dos trabajos presentados por el catedrático con motivo de la iniciación de los cursos de botánica de 1793 y 1794. Ambos son las primeras investigaciones publicadas en México en las que se aplicaron a las plantas mexicanas los postulados teórico-prácticos de la química Lavoisier.

El primer texto apareció en las Gacetas de literatura publicadas por Alzate. Cervantes inicia reconociendo la utilidad del sistema de Linneo para el mejor conocimiento de los vegetales y califica al análisis químico como el mejor método para averiguar sus propiedades y virtudes. Enseguida expone la manera de hacerlo de acuerdo a las noticias seguras publicadas al

¹² Alzate, José Antonio (2 de enero de 1789), "Carta al autor de esta gaceta", *Gaceta de Literatura*, t. 1, p. 92. Reimpresos por el Hospital de San Pedro, (1831) Puebla.

¹³ Alzate, José Antonio (18 de julio y 14 de agosto de 1789) *Gaceta de Literatura*, t. 1, pp. 178-80.

¹⁴ Aceves, Patricia (1993) *Química, botánica y farmacia en la Nueva España a finales del siglo XVIII*. Op. Cit.; (1995) Échanges scientifiques et controverses autour de la nomenclature chimique moderne dans la Viceroyauté de la Nouvelle Espagne, en Bensaude-Vincent B. y Abbri F. eds., *Lavoisier in European Context: Negotiating a new Language for Chemistry*, Watson Publishing International, Canton, pp. 193-206.

respecto¹⁵. Con este fin, describe las sustancias que le sirven de "nutrimento a los vegetales", como es el caso del agua, el aire, la luz y la tierra. Aclara que el agua no es un elemento sino un compuesto formado por hidrógeno y oxígeno y que este último entra en la constitución de los ácidos. Describe el papel del aire en la respiración vegetal y habla del nitrógeno y del gas carbónico; asimismo explica la necesidad de las plantas por la luz y el papel de la tierra en la nutrición vegetal. Se observa en lo anterior el uso los principios de la "nueva química".

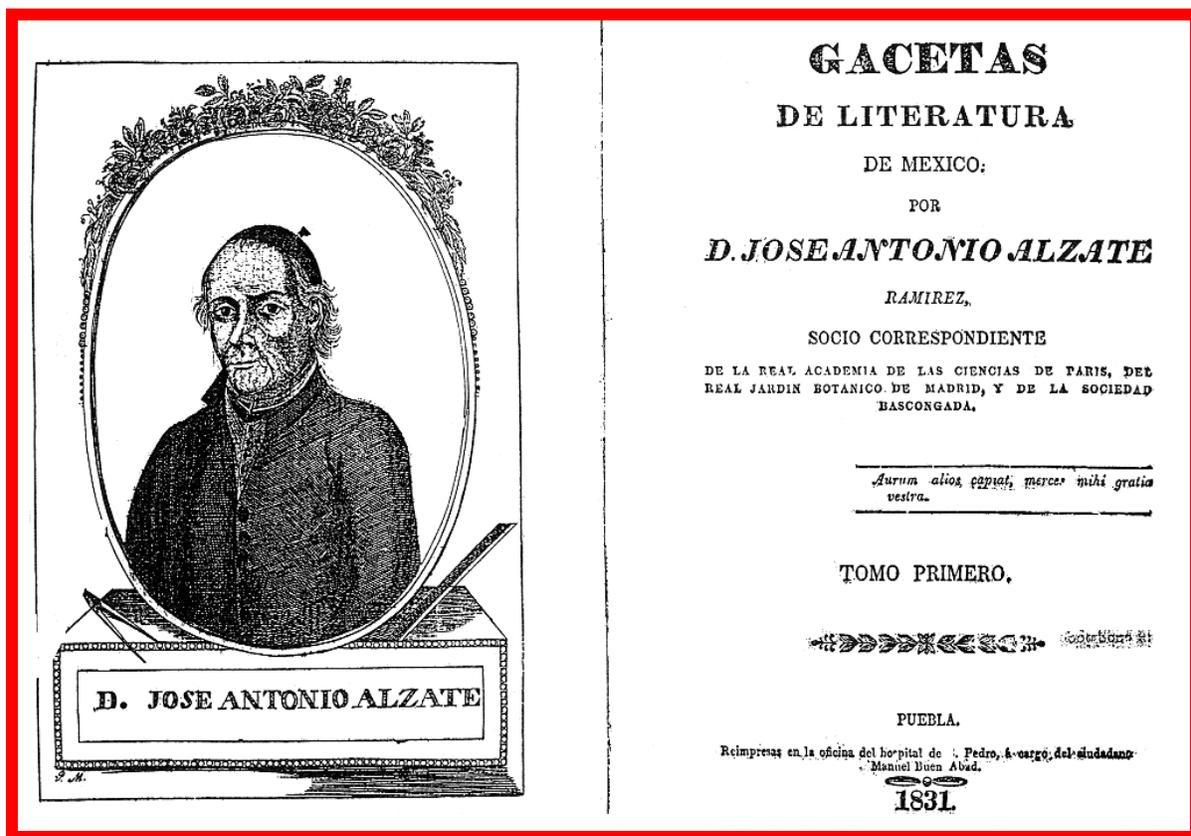


Figura 2. Portada de las Gacetas de Literatura, reimpresas en Puebla en 1831.

Luego describe los métodos para recoger los principios vegetales en el laboratorio y hace relación de sus principales propiedades físicas, químicas y farmacológicas. En algunos casos también da cuenta de la dosis y la forma en la que deben emplearse para curar, de las plantas que los contienen y de su distribución más común. A lo largo del texto, Cervantes invoca la autoridad de los científicos europeos: en botánica-médica cita a Linneo, Bahuino, Quer, Koenig, Wadel, Collin, Parmentier, Acosta y Sieffert; y en química da los nombres de Lavoisier, Chaptal, Macquer, Boerhaave, Ingenhouz, Sennebier, La Metherie, Hales, Duhamel, Sage, Baumé, Proust, Priestley, Crell, Bonnet, Tillet, Bucquet y Hermstad.

¹⁵ Cervantes, Vicente (27 de agosto de 1793) "Oración que pronunció en la apertura del curso de botánica el día 10. de junio de 1793 el Br. D. Manuel María Bernal, profesor de cirugía y discípulo de esta escuela, en el jardín del Real Palacio destinado interinamente para este efecto: compuesta por D. Vicente Cervantes, catedrático del Real Jardín Botánico de México", *Gaceta de Literatura*. t.3, pp. 158-83.

Entre las plantas mexicanas mencionadas por Cervantes encontramos el magüey, la sábila, el alcaxóchitl y el yoloxóchitl como ejemplo de vegetales que exhalan sus principios por la transpiración. En relación con las resinas nombra a la de jalapa y al guayacán. Entre los extractos hechos por "expresión" cita el de acacia. En el grupo de los mucílagos considera a la chíá, al chicalote, a la yerba de golondrina y a los socoyoles y tumbiriches. Enfatiza el hecho de que algunas plantas provenientes de Europa pueden ser sustituidas por otras que crecen en América. Tal es el caso de la sida del cabo en lugar de la malva común, de la malva vitifolia en vez del malvavisco y de algunos vegetales como el huacamotl, la yuca, la mala mujer y los piñones y avellanas purgantes.

El catedrático utilizó con precisión y de manera sistemática la nueva nomenclatura química y explica que la prefiere porque sus voces están "ya adoptadas generalmente por los mejores químicos de Europa y por ser muy común en México la obra de la nueva nomenclatura química". Entre las sales más frecuentemente halladas en las plantas incluye la potasa, sosa y amoniaco, así como los muriatos de sosa, nitratos y sulfatos de la misma base, oxalatos y tartritos. También hace referencia a los ácidos vegetales como el cítrico, málico, piromúxico y pyroleñoso: "los ácidos vegetales conocidos hasta ahora se distinguen únicamente en la proporción de hidrógeno y carbónico y en el grado mayor o menor de oxigenación que tienen".

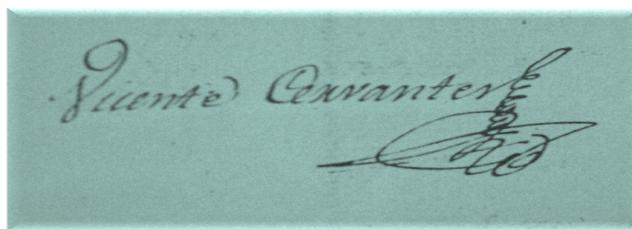
Una imagen de una firma manuscrita en tinta oscura sobre un fondo de papel verde claro. La firma dice "Vicente Cervantes" en una caligrafía cursiva y elegante, con un apunte final que se extiende hacia abajo y a la derecha.

Figura 3. Firma de Vicente Cervantes Mendo (Ledrada 1758 - Cd. De México 1829).

El segundo trabajo de Cervantes con referencia a la nueva química, también fue difundido por Alzate en sus *Gacetas de literatura*.¹⁶ En esta publicación, Cervantes estudia una planta conocida por los antiguos mexicanos como ulquahuitl, comúnmente denominada "árbol de ule". El cuerpo de la exposición incluye las plantas que suministran la resina elástica, los métodos utilizados en Brasil y en la Nueva España para extraerla, los resultados de sus experiencias realizadas con el jugo de la planta, tanto líquido como sólido y los usos de la resina. Vale la pena destacar que en los trabajos descritos, es notorio que Vicente Cervantes se hallaba inmerso en la red de comunicación científica internacional y que el intercambio de conocimientos Europa-América se realizaba en ambas direcciones. Esto se manifiesta tanto en el empleo de la bibliografía de la época como en la actualidad de los temas de investigación abordados.¹⁷

Al respecto conviene señalar que los expedicionarios en la búsqueda de la legitimación de sus trabajos, ante los ojos de las autoridades y cuerpos académicos tanto de la Península Española como de la Nueva España, se preocuparon en difundir la singularidad, exuberancia y riqueza de la flora mexicana con usos terapéuticos. Para tal fin, reconocieron y promovieron el establecimiento oficial de la materia médica vegetal mexicana, de una materia médica nacional.¹⁸

¹⁶ Cervantes, Vicente (2 de julio de 1794) "Discurso pronunciado en el Real Jardín Botánico el 2 de junio por el catedrático D. Vicente Cervantes", *Suplemento de la Gaceta de literatura*. t. 3, pp. 319-54.

¹⁷ Pastor Villegas, José (2006) *Páginas extremeñas sobre el caucho*, La Coria, Fundación Xavier de Salas, Trujillo.

¹⁸ Cervantes, Vicente, (1889) *Ensayo a la materia médica vegetal de México*, *El Estudio*, Secretaría de Fomento, México.

Además de su puesto de Catedrático de Botánica, entre 1791 y 1810, Cervantes desempeñó el cargo de boticario mayor de la botica del Hospital de San Andrés, donde contribuyó a la instrucción y modernización de la farmacia. Fue asimismo el dueño de la flamante botica del Relox. Las labores desempeñadas por Cervantes en estas instituciones, le permitieron ampliar su círculo de influencia y relacionarse con las élites vinculadas a la toma de decisiones en las esferas académica, económica y política.¹⁹ En el México Independiente, las cosas no cambiaron y varios de sus alumnos y amigos llegaron a escalar posiciones privilegiadas dentro de los gobiernos en turno. Esta situación le permitió a Cervantes ser un empresario exitoso en su botica, continuar al frente del Jardín y su cátedra y participar en la construcción de la nueva nación mexicana²⁰. Murió el 27 de julio de 1829.²¹

3. Química y Metalurgia en el Real Seminario de Minería

Durante el periodo virreinal la química y la metalurgia fueron aplicadas a la minería, actividad primordial de la economía novohispana. La experiencia acumulada en la extracción y el beneficio de los minerales, al paso de las centurias, se manifestó en la invención de procedimientos y artefactos, en la publicación de textos especializados sobre los avances en el mundo y en la Nueva España y sobre todo en los caudales de plata que cruzaron el océano. El auge económico alcanzado por la bonanza espectacular de sus minas para finales de la centuria dieciochesca, le permitió a la Nueva España suministrar el 66% de la plata acuñada a nivel mundial.²²

Acorde con el desarrollo alcanzado en este campo, en enero de 1792 abrió sus puertas el Real Seminario de Minería, institución donde se prepararían como especialistas, los jóvenes interesados en el trabajo de las minas y en conocer los misterios y riquezas del subsuelo.

Con la creación del Real Seminario de Minería se inició en México, una de las aventuras científicas más importantes para la historia de la enseñanza y la profesionalización de las ciencias modernas vinculadas a la minería. Al mismo tiempo, en este recinto se pusieron en marcha los mecanismos necesarios para realizar investigaciones que favorecieron los intercambios de información de la Nueva España con las redes internacionales de comunicación científica. En esta tarea titánica, el esfuerzo realizado por novohispanos y peninsulares abarcó la construcción de una infraestructura con aulas, talleres, laboratorios, gabinetes científicos y bibliotecas, así como la apertura de cátedras, la elaboración y publicación de libros, el fortalecimiento de la comunidad científica y la integración de una nueva cosmovisión de la sociedad.²³

La cristalización del proyecto del Real Seminario de Minería fue posible porque en él confluyeron los intereses de las élites ilustradas novohispanas y de la Corona española. Otro factor que aseguró la existencia de la institución durante este periodo y aún en años posteriores, fue la voluntad del gremio minero para proporcionar los fondos necesarios para su funcionamiento y manutención. Ya desde 1761 Francisco Javier Gamboa en sus *Comentarios a las Ordenanzas de*

¹⁹ Morales, Alba (2002) *El Hospital General de San Andrés: la modernización de la medicina novohispana (1770-1783)*, Biblioteca Historia de la Farmacia t. 2, Aceves P. ed. y coord., UAM-Xochimilco, México.

²⁰ Aceves, Patricia (2009) "Botánica, farmacia y química: Vicente Cervantes 1787-1829", en María Teresa Migas; Antonio González Bueno eds., *En el 250 aniversario del nacimiento de Vicente Cervantes (1758-1829): relaciones científicas y culturales entre España y América durante la Ilustración*, Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, pp. 101-16.

²¹ Archivo Histórico de Notarías, Fondo Antiguo, v. 2779, escribano Ignacio Montes de Oca, 21 de julio de 1829, ff. 335 v. - 338; 27 de julio de 1829, ff. 348-51; 23 de septiembre de 1829, ff. 412-15. Agradezco a la Maestra Graciela Zamudio su generosidad al indicarme la existencia y localización de estos testamentos.

²² Velasco Ávila, Cuauhtemoc (1988) *Estado y minería en México (1767-1910)*, Op. Cit.

²³ Aceves, Patricia (1993) *Química, botánica y farmacia en la Nueva España a finales del siglo XVIII*, Op. Cit..

Minería había dado una visión global de los aspectos jurídicos, económicos y tecnológicos de la minería novohispana.²⁴ El texto de Gamboa sirvió de base a la *Representación* que a nombre de los mineros del virreinato presentaron ante el rey Carlos III en 1774, Juan Lucas de Lassaga y Joaquín Velázquez de León. Los apoderados de los mineros incluyeron como sus principales demandas la creación de un Banco de Avío, de un Tribunal de Minería y de un Colegio Metálico para crear hombres de bien y suficientemente ilustrados.²⁵ La respuesta de la autoridad no se hizo esperar y una vez nombrado Ministro de Indias José de Gálvez en 1776 se constituyó el cuerpo de mineros atendándose casi a la letra las propuestas de la Representación. Al año siguiente fueron designados como director y administrador del Tribunal de Minería respectivamente, Velázquez de León y Lassaga, quienes se dieron a la tarea de efectuar una reestructuración a fondo de este sector que desembocó en la aprobación de las nuevas *Ordenanzas* de Minería en 1783.²⁶

Ante el fallecimiento casi simultáneo del director y del administrador del Tribunal Minería, el Rey decidió en 1786, violando las Ordenanzas de Minería, nombrar a Fausto de Elhuyar como sucesor de Velázquez de León en el puesto de director del Tribunal de Minería y encomendarle el proyecto del Colegio, lo cual provocó las protestas y el descontento entre los novohispanos.²⁷

Vale la pena mencionar que a la Corona le interesaba poner al frente de la estratégica empresa minera novohispana a un funcionario español competente y fiel a los intereses de la monarquía como de Elhuyar, para darle continuidad a los trabajos ya en marcha y además dar comienzo a otras acciones tendientes a incrementar aún más los beneficios de los metales preciosos por los métodos de fundición con plomo y por amalgamación con mercurio; este último proceso inventado por Bartolomé de Medina en la Nueva España en 1555 le había permitido al imperio español obtener caudales fabulosos de plata.^{28,29} En este contexto corría el año de 1787, cuando de Elhuyar desembarcó en Veracruz en compañía de 11 técnicos alemanes para supervisar los trabajos de las minas e investigar la posible aplicación en ellas del método de amalgamación de Born; pero ya el asunto había sido discutido en público y provocado las críticas de algunos élites intelectuales criollas.³⁰

Una muestra de ello son los tres artículos publicados por el criollo José Antonio de Alzate y Ramírez, entre 1787 y 1788, en sus *Observaciones sobre la física, historia natural y artes útiles*, para señalar oportunamente que los conocimientos de los americanos en materia de metalurgia no eran inferiores a los de sus homólogos alemanes. Por un lado, el método del barón de Born era una variante del método de cazo inventado por Barba en Perú en el siglo XVII, y por el otro, el método de Barba era a la vez una variante del método inventado por Bartolomé de Medina en

²⁴ Gamboa, Francisco Xavier (1761) *Comentarios a las Ordenanzas de Minas dedicados al Catholico Rey nuestro Señor, Don Carlos III*, Joachin Ibarra. Madrid. Edición facsimilar, Miguel Angel Porrúa (1987), con una introducción de Elías Trabulse, México.

²⁵ Lassaga de, Lucas de Lassaga; Velázquez de León, Joaquín (1774), *Representación que a nombre de la minería de esta Nueva España hacen al rey nuestro señor sus apoderados de ella...*, Felipe Zúñiga y Ontiveros, México.

²⁶ (1783) *Reales Ordenanzas para la dirección, régimen y gobierno del importante Cuerpo de la Minería de Nueva España y su Real Tribunal General*, Madrid.

²⁷ Brading, David (1975) *Mineros y comerciantes en el México borbónico (1763-1810)*, Fondo de Cultura Económica, México.

²⁸ Bargalló, Modesto (1969) *La amalgamación de los minerales de plata*, Compañía Fundidora de Fierro y Acero de Monterrey, México.

²⁹ Aceves, Patricia (2005) "La Minería en la América Española", en *Ciencia y técnica en Latinoamérica en el periodo virreinal*, Ediciones CESCE SA, Madrid, pp.406-33.

³⁰ Aceves, Patricia (1995) "Intercambios científicos en la Nueva España: una nueva lectura de la comisión minera", en Javier Puerto coordinador, *De la ciencia ilustrada a la ciencia romántica*, Doce Calles, Madrid, pp. 359-75.

1555. Arguyó también que el método de beneficio por azogue (llamado de patio) utilizado en el país, presentaba menos dificultades que el de Born.³¹ Al cabo de unos cuantos años, el fracaso de los trabajos de la Comisión minera alemana le daría plenamente la razón a Alzate.



Figura 4. Mina de Proaño en Zacatecas donde se aprecian los montones de mineral procesados por el Método de Patio.

Una respuesta a los ataques incisivos de Alzate, fue la publicación en 1791 del *Suplemento al Ensayo de Metalurgia*, de Francisco Javier Sarría, Esta obra tenía el propósito de dar a conocer:

*La noticia del beneficio de azogue establecido en Hungría por el barón de Born; una idea sucinta de la nueva teórica del célebre Lavoisier sobre la Química; un breve cotejo entre el método de cocimiento inventado por el licenciado Barba y el del citado Born; y un nuevo método de fundir los minerales de cobre y plomo con ley de plata.*³²

Sarría quien llegó a la Nueva España en 1767, era el fundador de la Real Lotería de la Nueva España y en 1784 había publicado *El Ensayo de Metalurgia*. Su cercanía con las élites administrativas y académicas lo indujo a seguir el curso de Cervantes y a participar en los actos públicos de fin de curso de la Cátedra de Botánica en 1788.³³ La importancia del *Suplemento al*

³¹ Alzate y Ramírez, José Antonio (30 de julio y 30 de octubre de 1787, 12 de febrero de 1788) "Observaciones sobre la física, historia natural y artes útiles", en (1980) *Obras, I, Periódicos*, UNAM, México, pp. 224-41. Edición, introducción, notas e índices por Roberto Moreno de los Arcos.

³² Sarría, Francisco Javier (1791) *Suplemento a la Ensayo de Metalurgia*, Felipe Zúñiga y Ontiveros, México.

³³ Aceves, Patricia; Ernesto Soto Reyes Garmendia (2009) "Fuentes para la Historia de la Química: La Obra de Francisco Xavier Sarría", en A. M. Alfonso-Goldfarb et al coords., *Centenário Simão Mathias: documentos, métodos e identidade da História da Ciência*, PUC-SP, São Paulo, pp. 243-54.

Ensayo de Metalurgia radica en que puso a disposición de un público amplio los fundamentos y la nomenclatura de la química moderna en fechas cercanas a la de su publicación en Europa. Es evidente que Cervantes, Sarria y de Elhuyar, al ser todos ellos altos funcionarios de la Corona encargados de implementar las Reformas Borbónicas, estuvieron en comunicación y utilizaron el *Suplemento* como vehículo para difundir tanto los nuevos conocimientos, como para ganarse el consenso de la opinión pública ante los intentos fallidos de la Comisión minera para introducir el método de Born en las minas de la Nueva España.³⁴

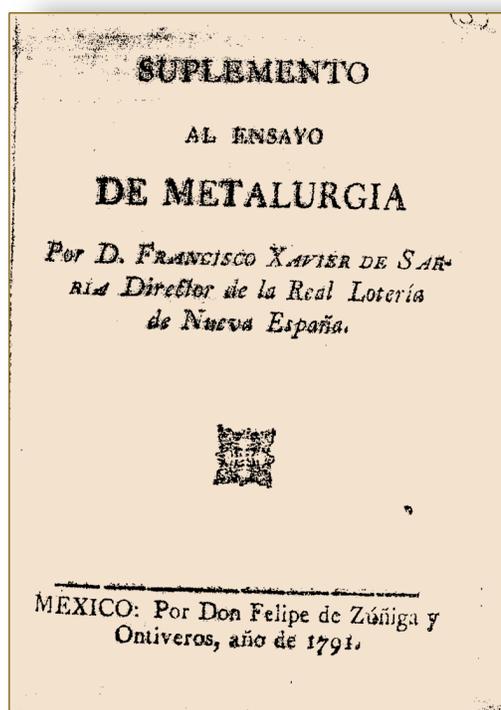


Figura 5. Portada del Suplemento al Ensayo de Metalurgia (1791).

Estos tres personajes eran miembros de una tertulia ilustrada en donde se discutían asuntos no sólo de ciencia, religión y estado, sino también los acontecimientos de la Revolución Francesa. A esta tertulia asistieron asimismo Miguel Constanzó director de empedrados y obras públicas de la ciudad, y otras personalidades del gremio médico, farmacéutico y minero. Entre ellos estaba el médico francés y fracmasón Esteban Morel, quien introdujo la inoculación de la viruela como preventivo en 1779. El final de estas reuniones no fue nada feliz, ya que en 1794 Morel fue sometido a juicio por el temible Tribunal de la Inquisición bajo los cargos de herejía, desobediencia a las leyes de Dios, lectura y posesión de libros prohibidos y divulgación de noticias acerca de la

³⁴ Aceves, Patricia (1995) "Negociando un nuevo lenguaje para la química en México: El *Suplemento al Ensayo de Metalurgia* de Francisco Xavier de Sarria", en *Las ciencias químicas y biológicas en la formación de un mundo nuevo, Estudios de Historia Social de las Ciencias Químicas y Biológicas*, Vol. 2, UAM-X, México, pp. 83-94.

Revolución Francesa, entre otros cargos.³⁵ No deja de llamar la atención el que ninguno de sus contertulios haya sido inculpado.³⁶

El Real Seminario de Minería abrió sus puertas el primero de enero de 1792, con el propósito de preparar especialistas tanto en el laboreo de las minas, como en el beneficio de los metales en minerales pobres en ellos y que comúnmente eran desechados.³⁷ El proyecto elaborado por Fausto de Elhuyar retomaba en lo fundamental los planes presentados por Velázquez y Lassaga en la *Representación* de 1774, pero también recuperaba en parte los programas del Seminario de Vergara; en donde de Elhuyar había impartido la cátedra de química y había alcanzado la celebridad junto a su hermano Juan José por sus trabajos sobre el aislamiento del elemento químico wolframio hoy conocido como tungsteno.

El objetivo del establecimiento era *formar a sujetos conocidos y educados desde su niñez en buenas costumbres e instruidos en toda la doctrina necesaria para el más acertado laborio de las minas, concertación de los buenos métodos de las operaciones y de mayor perfección.*

La enseñanza del Seminario era gratuita para los 25 alumnos de dotación y de paga para los alumnos porcionistas o pensionistas, también podían acudir a las clases alumnos externos. Se trataba de una educación integral que además del aspecto científico contemplaba una rigurosa instrucción religiosa y política, la cual incluía el adiestramiento en los modales, formas de pensar, modas y costumbres de las élites europeas. Tanto la organización de la institución como sus planes y programas de estudio se elaboraron siguiendo los últimos adelantos de la ciencia. Las lecciones eran teórico-prácticas de acuerdo a las doctrinas y textos más modernos. Además el Seminario era independiente de la Real y Pontificia Universidad pero dependiente del Tribunal de Minería y del Rey.³⁸ Al frente de las cátedras estuvieron profesores de reconocido prestigio como Fausto de Elhuyar y Andrés Manuel del Río que habían estudiado en las mejores escuelas de Europa; asimismo completaban la plantilla Andrés José Rodríguez, Antonio Bataller y Luis Lindner.³⁹ Sin embargo, en el nombramiento de estos profesores fueron dejadas de lado las aspiraciones de los novohispanos para ocupar la cátedras, y las Ordenanzas de Minería fueron violadas al no realizarse su selección a través de un examen público.⁴⁰

Las clases de química del Real Seminario de Minería, debían impartirse después de las de matemáticas y física y antes de las de mineralogía. Sin embargo, cuando Andrés Manuel del Río llegó a México en 1794, los alumnos no habían cursado aún la Cátedra de Química porque Francisco Codón que era el catedrático designado, se negaba a cruzar el océano a consecuencia de los conflictos bélicos. Por lo que se decidió invertir el orden de las cátedras e impartir primero la de Mineralogía a cargo de Del Río.⁴¹ De esta manera, en adelante la Cátedra de Química pasó a

³⁵ Schifter, Liliana (2002), *Medicina, minería e inquisición en la Nueva España: Esteban Morel (1774-1795. Biblioteca Historia de la Farmacia*, Vol. 3, UAM-Xochimilco, México.

³⁶ Morel se quitó la vida en su celda en febrero de 1795, antes de que terminaran las audiencias preparatorias. Ver: Archivo General de la Nación, *Inquisición*, 1795, vol. 1379, exp. 11, Relación de la causa seguida por el Santo Oficio contra el doctor Don Esteban Morel, ff. 228-86.

³⁷ Izquierdo, José Joaquín (1958) *La primera casa de las ciencias en México*, Editorial Ciencia, México.

³⁸ Flores Clair, Eduardo (2000) *Minería, educación y sociedad. El Colegio de Minería 1774-1821*, INAH, México.

³⁹ Fausto de Elhuyar estudió química en París con Rouelle (quien fue el maestro de Lavoisier) y con Werner en Freiberg entre 1772 y 1781, posteriormente en 1786 la Corona lo envió a Alemania para estudiar el nuevo método de amalgamación de la plata presentado por Born un año antes. Por lo que se refiere a Andrés Manuel del Río, estudió cuatro años en París en el "Collège de France" con Jean D'Arcet y luego pasó a Freiberg y a Schemnitz donde coincidió con Humboldt y Lindner, a continuación viajó a Inglaterra, Escocia y Francia. En lo concerniente a Luis Lindner, quien fue designado catedrático de química, era un mineralogista alemán que llegó con de Elhuyar en 1787.

⁴⁰ Aceves, Patricia; Mendoza, Martha (2001) "La institucionalización de la ciencia moderna en México: el Real Seminario de Minería". En Carlos Viesca coord., *Historia General de la Medicina, Medicina novohispana, Siglo XVIII*, Vol. IV, UNAM-Academia Nacional de Medicina, México, pp. 469-80.

ser el último curso del programa. El primer curso de esta disciplina inició en 1797 bajo la dirección de Luis Lindner, quien enfermó y fue sustituido por el director del Seminario, Fausto de Elhuyar. A partir del siguiente año escolar Lindner ocupó la cátedra hasta que cayó enfermo de muerte en 1804. Por tal motivo la enseñanza pasó al ex-alumno Manuel Cotero, quien la desempeñó hasta 1829.



Figura 6. Edificio de la primera sede del Real Seminario de Minería.

El curso de química estaba compuesto por dos partes: la primera estudiaba los principios generales y la nomenclatura de las nuevas teorías químicas elaboradas por Lavoisier y colaboradores, la segunda parte estaba dedicada a la docimasia y a la metalurgia, haciendo énfasis en los aspectos técnicos y aplicativos de la química relacionados específicamente con las actividades mineras locales.

Como libro de texto se utilizó el *Tratado elemental de chimica* de Lavoisier, que en 1797 fue traducido del francés por el catedrático de botánica Vicente Cervantes para el uso de los estudiantes del Real Seminario de Minería.⁴² Otros textos usados fueron los *Elementos de química* de Jean Antoine Chaptal y *La nueva teórica y práctica del beneficio de los metales de oro y plata por fundición y amalgamación* del criollo Joseph Garcés y Eguía; ambos seguían los postulados de

⁴¹ Andrés del Río inició sus lecciones de mineralogía en 1795, inspiradas principalmente en la ortodoxia neptunista de su maestro Werner. Las obras que publicó para el uso del Real Seminario de Minería pusieron al alcance del público los últimos avances en las ciencias de la tierra, que apenas estaban en proceso de delimitar sus campos de estudio. Sus *Elementos de Orictognosia* (1795, 1805) fueron la primera obra de este género escrita en América y continuaron utilizándose como libro de texto hasta mediados del siglo XIX. Otras obras que publicó son las *Tablas mineralógicas* de Karsten (traducidas y añadidas del alemán por del Río en 1804), y el resumen de la *Pasigrafía geognóstica* de Humboldt representada en tres láminas. Ver: Del Río, Andrés Manuel (1992) *Elementos de Orictognosia (1795-1805)*, SEFI-UNAM, México. Edición y Estudio introductorio de Raúl Rubinovich.

⁴² Lavoisier, A. L. (1797) *Tratado elemental de chimica*, Op.Cit.

la nueva química. Asimismo, durante los primeros años de la cátedra los mejores alumnos se encargaron de sustentar los Actos públicos de fin de curso y recibieron como premio el *Diccionario de química* de Macquer y el *Diccionario universal* de Valmont de Bomare.

En los laboratorios del Real Seminario de Minería como en los de la Real Casa de Moneda se realizaron numerosos análisis cualitativos y cuantitativos de los distintos productos del reino mineral. Entre estos destacan los efectuados por del Río al plomo pardo de Zimapán, mediante los cuales descubrió el eritronio que hoy es conocido como vanadio.

Los registros existentes permiten conocer que de 1797 a 1809 se inscribieron a la cátedra de química un total de 68 alumnos, de los cuales 61 cursaron la totalidad de las materias. Esto quiere decir que en el transcurso de los 18 años transcurridos desde la apertura del Seminario, sólo 61 estudiantes lograron cubrir las cátedras correspondientes al plan de estudios. Para el período de 1810 a 1821 la información se encuentra incompleta y la cifra correspondiente es de 75 estudiantes. Sin embargo hay que recordar que regularmente asistieron a la cátedra aficionados y profesionales de otras áreas, como era el caso de los médicos y farmacéuticos. A partir de 1798 los primeros alumnos que habían concluido los cursos, se trasladaron a los principales reales mineros del país para efectuar dos años de prácticas y una tesis; cumplidos estos requisitos pudieron examinarse para obtener el título correspondiente.⁴³

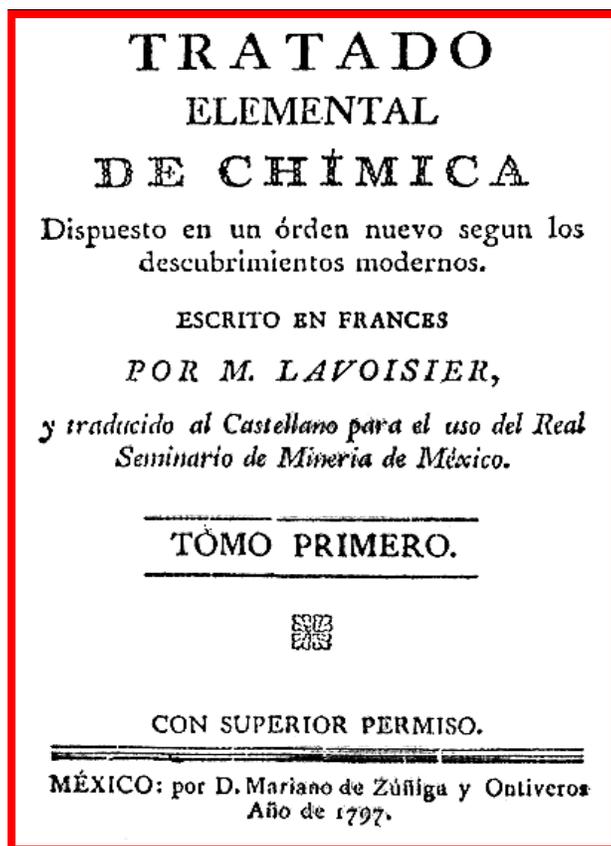


Figura 7. Portada del Tratado Elemental de Química traducido por Vicente Cervantes en 1797.

⁴³ Ramírez, Santiago (1982) *Datos para la historia del Colegio de Minería*, SEFI-UNAM, México.

En vísperas de la consumación de la independencia, la dirección de las distintas cátedras del Seminario de Minería había pasado a cargo de ex alumnos del plantel y esta institución se había convertido en el centro científico y académico más importante de la Nueva España. Consumada la independencia en 1821, Fausto de Elhuyar renunció a su cargo y regresó a España; por su parte, Andrés del Río y Vicente Cervantes permanecieron en el México Independiente y participaron activamente en la elaboración de los planes de instrucción pública del naciente Estado mexicano. Para entonces, las actividades de docencia, investigación y servicio realizadas por el personal vinculado al Seminario habían favorecido la vertebración de una infraestructura y de una comunidad de profesionales y científicos en áreas diversas. Comunidad que habría de permanecer y reproducirse en la nueva nación mexicana, y se encargaría de proveer cuadros calificados a la nueva sociedad: científicos, catedráticos, ministros, diputados, empresarios y aún connotadas personalidades del mundo artístico.

Comentario final

A lo largo de este artículo se puso en evidencia que en los últimos años del siglo XVIII y los primeros del siglo XIX, la Nueva España formaba parte de la red internacional de comunicación científica, lo que favoreció los intercambios (de personas, conocimientos teórico-prácticos, saberes, publicaciones, técnicas, instrumentos, minerales, vegetales y otras muchas cosas más) entre este virreinato y otras regiones y países. A esta situación coadyuvaban una gama de factores culturales, políticos, geográficos, sociales, y económicos, tanto de índole local como provenientes del exterior.

En este periodo, el auge cultural y económico del virreinato permitió el desarrollo de la sociedad novohispana y el establecimiento de una compleja organización socioeconómica, jurídica y administrativa. Como consecuencia, las élites locales (con un gran porcentaje criollo), elaboraron, aportaron los recursos materiales y pusieron en marcha una serie de proyectos para garantizar sus intereses y el desenvolvimiento de la colonia. Por otra parte, las medidas dictadas por la Corona bajo la forma de las Reformas Borbónicas y la llegada de las expediciones botánica y minera originaron un escenario en el que hubo puntos de coincidencia, pero también desacuerdos que provocaron conflictos y enfrentamientos.

Este contexto hizo posible y catalizó el proceso de adopción y aplicación de la química moderna en México en ámbitos sociales importantes como lo eran la salud y la minería. Así, los trabajos de Lavoisier y sus colaboradores fueron dados a conocer por distintos medios y publicaciones, casi en forma simultánea a su aparición en Europa. En lo anterior es necesario tener en cuenta que durante el periodo virreinal, la química se cultivó en la Nueva España en dos áreas que contaban con una antigua tradición teórico-práctica: la utilización de las plantas medicinales en la terapéutica y el beneficio de los minerales de oro y plata. Estos dos ámbitos, al tener una gran importancia económica y social eran fundamentales para el desarrollo de los habitantes de esta pujante colonia, y formaban parte de los proyectos de sus élites.

En los proyectos del Real Jardín Botánico y del Real Seminario de Minería coincidieron los intereses de distintos sectores que pudieron negociar entre sí para hacer viables estos establecimientos. Gracias a ello, dentro de sus cátedras se institucionalizó la enseñanza y la investigación de las ciencias modernas; y por este medio se asestó un golpe definitivo a las concepciones aristotélicas y galénicas aún sostenidas en la Real y Pontificia Universidad. En adelante, los amantes de las ciencias y las artes, pudieron cursar estas cátedras y tener acceso a los últimos avances del conocimiento.

Si bien la educación de los jóvenes dentro del Real Jardín Botánico y el Real Seminario de Minería estuvo encaminada a servir a los designios de la Corona española, ello no impidió que varios egresados del último, pelearan y aún murieran por la independencia. En los desórdenes de 1810 y 1811 perdieron la vida cinco de los más brillantes, los cuales antes de salir a practicar en la minas compartieron el honor de haber sustentado los actos públicos de la cátedra de química.

Semblanza de la Dra. Patricia Elena Aceves Pastrana



Licenciada en Química Farmacéutica Biológica (1969) y Maestra en Historia de México (1989) por la Universidad Nacional Autónoma de México, Doctora en Química Orgánica por la Universidad Claude Bernard de Lyon, Francia, (1976) y Doctora *Honoris Causa* por la Universidad Complutense de Madrid (2000). Desde 1979, labora como profesora Titular C de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, en el Departamento de Sistemas Biológicos; de 1998 a 2002, fue rectora de esta Casa de Estudios. A partir de 1989, es profesora en la Facultad de Filosofía y Letras de la UNAM. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores y es miembro de la Academia Internacional de Historia de la Farmacia, de la Real Academia de Farmacia de España, de la Academia Mexicana de Ciencias y de la Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Ha publicado 70 artículos y 16 libros sobre la historia de la química y la farmacia en México y en el mundo. Como Coordinadora de la Red de Intercambios para la Historia y la Epistemología de las Ciencias Químicas y Biológicas es la editora de las colecciones: *Estudios de Historia Social de las Ciencias Químicas y Biológicas* (7 volúmenes) y *Biblioteca de Historia de la Farmacia* (5 volúmenes).



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 1-16. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

FACTORES INMUNOLÓGICOS QUE PARTICIPAN EN LA PROGRESIÓN DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR

IMMUNOLOGICAL FACTORS INVOLVED IN THE PROGRESSION OF PULMONARY TUBERCULOSIS

Rogelio Hernández Pando, Dulce Mata, Diana Aguilar, Héctor Orozco
Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán",
Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP 14000. México DF
rhdezpando@hotmail.com

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica que primordialmente afecta a los pulmones y produce profundas alteraciones en el sistema inmunológico. Aunque la mayoría de las personas que se infectan con el bacilo tuberculoso no desarrollan la enfermedad (90%), cuando existen condiciones que producen inmunosupresión como la infección con el VIH, desnutrición o diabetes, el riesgo de desarrollar tuberculosis activa se incrementa significativamente. Es interesante que durante el curso de la tuberculosis progresiva, aun en ausencia de condiciones que produzcan inmunosupresión, existen factores que inducen una prolongada y profunda disminución de la respuesta inmunológica. La mayoría de estos factores son moléculas con potente actividad antiinflamatoria que son probablemente producidas en gran cantidad durante la enfermedad avanzada para evitar el daño tisular, pero la consecuencia es la supresión de la inmunidad protectora que permite el crecimiento bacteriano contribuyendo a la progresión de la enfermedad. En este trabajo se revisan en particular estos factores que suprimen la inmunidad protectora. También de forma breve se comenta como su manipulación constituye formas racionales de inmunoterapia.

Palabras clave: Tuberculosis, inmunosupresión, modelos experimentales.

Abstract

Tuberculosis is a chronic infectious disease which essentially affects the lungs and produces profound abnormalities on the immune system. Although most people infected by the tubercle bacillus (90%) do not develop the disease, when coexisted alterations in the immune system, such as co-infection with HIV, malnutrition, or diabetes, the risk of developing active disease increases considerably. Interestingly, during the course of active disease, even in the absence of immunosuppressive conditions, there is a profound and prolonged suppression of Mycobacterium tuberculosis-specific protective immune responses. Several immune factors can contribute to downregulate the protective immunity, permitting disease progression. In general, many of these factors are potent anti-inflammatory molecules that are probably overproduced with the intention to protect against tissue damage, but the consequence of this response is a decline in protective immunity facilitating bacilli growth and disease progression. Here are reviewed some factors that deregulate protective immunity in TB. Their manipulation as novel forms of immunotherapy are also briefly commented.

Keywords: Tuberculosis, immunosuppression, experimental models.

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica que principalmente afecta a los pulmones y produce profundas alteraciones del sistema inmunológico [1]. La respuesta inmunológica tiene una participación fundamental en el curso de la infección producida por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), ya que del 90 al 95% de las personas que se infectan por primera vez no desarrollan la enfermedad. Sin embargo, cuando existen anomalías del sistema inmunológico que le producen supresión, como sucede en la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana, desnutrición o diabetes, el riesgo de desarrollar TB se incrementa considerablemente.

Es interesante que aun en ausencia de inmunosupresión, hay una profunda y prolongada disminución de la respuesta inmunológica protectora en contra del Mtb durante el curso de la enfermedad. Diversos factores inmunológicos pueden contribuir a esta inmunosupresión, lo cual contribuye con la progresión de la enfermedad. Muchos de estos factores inmunosupresores son moléculas con actividad anti-inflamatorias potente, que muy probablemente se producen de forma abundante para protegerse del daño tisular ocasionado por la inflamación excesiva, pero la consecuencia de esto es una acentuada disminución de la respuesta inmunológica protectora, con lo cual se facilita el crecimiento de la bacteria y el agravamiento de la enfermedad. Es por lo tanto un objetivo fundamental de los investigadores que trabajan en este campo, la caracterización de los factores inmunológicos que contribuyen con la protección y progresión de la enfermedad [1]. Teóricamente con esta información se podría reemplazar la respuesta inmunopatológica por la protectora, para posteriormente diseñar cursos cortos de antibióticoterapia suplementada con inmunoterapia. De ser exitoso, este tratamiento combinado permitiría acortar el tiempo de tratamiento, contribuyendo así con el control de esta importante enfermedad infecciosa.

En el presente trabajo se describirán brevemente los factores inmunológicos que permiten el control del crecimiento bacteriano y sobre todo se describirán aquellos que contribuyen suprimiendo a la respuesta inmunológica protectora.

Mecanismos inmunológicos protectores en la tuberculosis

Mtb es una bacteria intracelular facultativa que generalmente infecta a los pulmones por vía aerogénica. En consecuencia, son los macrófagos alveolares y las células epiteliales bronquiales y alveolares las primeras que confrontan y son infectadas por el agente infeccioso. De hecho se considera a los macrófagos alveolares como las células más importantes para contener inicialmente la infección. Las interacciones iniciales de las bacterias con el macrófago se llevan a cabo por receptores de la membrana celular, tales como los receptores para la porción Fc de anticuerpos o para ciertos factores del complemento [2], así como para azúcares como la manosa [3], proteínas surfactantes [4], CD14 [5] y CD43 [6]. Los resultados de diversos experimentos in-vitro indican que la respuesta celular dependerá del tipo de receptor participante, por ejemplo la participación de receptores Fc induce la producción de radicales libres de oxígeno y además promueve la fusión de la vacuola fagosómica con los lisosomas, de esta forma contribuye a la destrucción de la bacteria a través de la acción concertada de radicales libres de oxígeno y nitrógeno más enzimas lisosomales. Debido a que el Mtb reside en compartimentos vesiculares citoplásmicos específicos, antígenos específicos son presentados por los macrófagos en un contexto de proteínas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) a los linfocitos T CD4+ de clase 1 (Th-1), los cuales tienen una participación esencial en la respuesta protectora en contra de Mtb, pues cuando estas no están presentes no es posible controlar el crecimiento bacteriano [7,8]. Por lo tanto, los participantes esenciales en el control del crecimiento bacteriano son los macrófagos activados por la interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN γ) producidas por las células Th-1. Diversos estudios en animales y humanos han confirmado esto, como lo son reportes de pacientes con mutaciones en los genes que codifican dichas interleucinas o sus receptores los cuales son muy susceptibles a infectarse y desarrollar formas graves de TB (9,10,11), o como sucede en las personas con SIDA en las que el virus destruye preferencialmente a las células Th-1. Las células Th-1 también contribuyen en la eliminación de las bacterias a través de la apoptosis de macrófagos infectados por intermediación del receptor de FAS y su ligando [12]. Otra importante participación de los linfocitos Th-1 es la activación de los linfocitos CD-8 [13], que son también importantes protagonistas en la eliminación de las bacterias, como lo demuestran los estudios realizados en ratones deficientes de las moléculas CD8, TAP y perforinas que son muy susceptibles a la infección por Mtb [14, 15]. Las células CD-8 eliminan las bacterias por su actividad citolítica y la producción de citocinas, pues son capaces de secretar IFN γ a través de la activación de su receptor de antígenos y por interactuar con células dendríticas [16]. Los mecanismos citolíticos de las células CD-8 se asocian con la exocitosis de sus gránulos que contienen las proteínas líticas perforinas y granzimas [15, 17].

Las respuestas fundamentales de la inmunidad adquirida se dividen en celulares y humorales, las cuales incluyen respectivamente la activación de los linfocitos T y producción de citocinas y la maduración de los linfocitos B y producción de anticuerpos, no son respuestas excluyentes, puesto que los linfocitos CD4 Th-2 producen citocinas que se requieren para la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, así como para el cambio de isotipo de anticuerpos. Por su parte los linfocitos B son capaces de presentar antígenos específicos a las células T. Debido a la localización intracelular del Mtb, con frecuencia se ha considerado a la inmunidad humoral como no protectora. Sin embargo, sobre todo al inicio de la infección, anticuerpos solos o con citocinas pueden evitar la infección de la mucosa respiratoria. De hecho, resultados de diversos laboratorios muestran que anticuerpos específicos contra la bacteria tienen una respuesta protectora importante en diferentes estadios de la enfermedad [18-20], por ejemplo incrementando la internalización y lisis de bacilos Calmette-Guerin (BCG) por neutrófilos y monocitos/macrófagos. Más aun, los bacilos BCG cubiertos por anticuerpos se procesaron y presentaron con más eficiencia por las células dendríticas a los linfocitos T CD4+ y CD8+ mejorando así la respuesta de inmunidad celular. Tanto anticuerpos de clase IgG como IgA existen en la superficie mucosa de las vías respiratorias inferiores [21] y una nueva forma de inmunoterapia para la TB es la administración pasiva en ratones de anticuerpos monoclonales IgA en contra del antígeno dominante alfa-cristalina [22] y la administración de IFN γ en

combinación con la IgA fue aun más eficiente [23]. Por lo tanto, parece ser que la inmunidad humoral también participa en la respuesta protectora en contra de Mtb y puede ser utilizada como una forma nueva de inmunoterapia.

Además de los macrófagos alveolares, las células epiteliales son otra población que interactúa tempranamente con Mtb. De hecho, el número de células epiteliales triplica al de los macrófagos y por lo tanto la capacidad que estas células tienen de interactuar con las bacterias es muy alta. Una de las primeras evidencias que mostraron esa interacción fue derivada de un estudio en el que se determinó la existencia de DNA micobacteriano en autopsias de individuos muertos por causas ajenas a la TB. En este estudio se demostró la presencia de DNA del Mtb en fagocitos no profesionales como los neumocitos tipo II y las células del epitelio bronquial, así como en fibroblastos y células endoteliales [24]. Además, diversos estudios in-vitro han demostrado y caracterizado la interacción entre células epiteliales y Mtb [25]. De hecho, las células epiteliales son capaces de conformar un ambiente pro-inflamatorio al secretar la quimiocina IL-8 e inducir la producción de óxido nítrico [26].

Un importante grupo de moléculas de la inmunidad innata que producen las células epiteliales en contra de los microorganismos son las defensinas [27], las cuales son una familia de péptidos catiónicos constituidos por 30 a 50 aminoácidos que existen en las células mieloides y epiteliales de todas las especies. Se sabe que estas proteínas tienen actividad antibacteriana [28], anti-fúngica [29] y antiviral [30]. Las defensinas se clasifican como de tipo α , β , θ de acuerdo a la posición del aminoácido cisteína y del número de puentes disulfuro que estas tengan [31, 32]. En las células fagocíticas, las defensinas representan el componente principal de destrucción de microorganismos independiente de los radicales de oxígeno [33, 34]. El mecanismo de acción de es aparentemente la destrucción de la membrana celular bacteriana y algunas de ellas pueden penetrar al citoplasma del microorganismos afectando su metabolismo [35, 36]. Ratones singénicos infectados con Mtb por vía intratraqueal sobre-expresan rápidamente defensinas beta 3 y 4, las cuales se mantienen durante toda la fase temprana de control del crecimiento bacteriano (primer mes), posteriormente su expresión disminuye acentuadamente durante la fase progresiva de la enfermedad en coexistencia con un elevado incremento de la carga bacteriana [37]. En un modelo de infección latente existe elevada expresión de ambas defensinas durante todo el tiempo de observación experimental en el que la carga bacteriana se mantiene baja y estable, pero la producción de defensinas disminuye significativamente cuando se reactiva experimentalmente y se desarrolla la enfermedad a través de la administración de glucocorticoides [37]. La defensina beta 2 humana ha sido identificada en células epiteliales de la tráquea y pulmones [38, 39], la misma defensina ha sido identificada en lavados bronquiales de pacientes con infección pulmonar por las micobacterias atípicas *M avium* y *M. intracellulare* [40]. Los monocitos transfectados con la beta-defensina humana 2 controlan significativamente mejor el crecimiento bacteriano que los monocitos no transfectados [41]. Las células epiteliales alveolares neumocitos II humanas infectadas in-vitro con Mtb expresan beta-defensina tipo 2 y estudios de inmunolocalización muestran gran cantidad de inmunomarcaje para esta defensina en la pared y citoplasma de bacterias intracelulares lisadas [36]. Experimentalmente, ratones infectados con Mtb y que son tratados con la defensina de neutrófilos HNP-1 muestran reducción significativa de la carga bacilar en pulmones, hígado y bazo [42], lo cual sugiere que las defensinas son un componente importante de la inmunidad innata que contribuye en el control del crecimiento bacteriano y como se mencionara después puede también ser una nueva forma de inmunoterapia.

Mecanismos inmunológicos que contribuyen a la progresión de la tuberculosis

Varios son los factores inmunológicos que contribuyen en la progresión de la TB. La mayoría de ellos se relacionan con la respuesta natural anti-inflamatoria cuyo objetivo principal es prevenir el daño tisular por inflamación excesiva. En consecuencia, es claro que el balance entre la respuesta pro y anti-inflamatoria es crucial en la evolución de esta enfermedad

infecciosa crónica y es factible que intercediendo en estas respuestas a través de estrategias diversas, se puedan reactivar los factores protectores o interferir con los factores deletéreos, permitiendo así que el sistema inmunológico pueda eliminar eficientemente a las bacterias. Algunos de los factores supresores se describen a continuación.

Mecanismos de evasión de la micobacteria que afectan la función macrófaga

Como se describió anteriormente, Mtb interactúa con diversos receptores del macrófago lo cual determina en parte la evolución temprana de la infección. La interacción de la bacteria con el receptor C3 del complemento previene la producción de radicales libres de oxígeno y bloquea la maduración del fagosoma evitando la fusión con los lisosomas [43]. Una vez que las bacterias son fagocitadas, la mayoría se localizan en los fagosomas [44], los cuales se derivan de la membrana celular y tienen diversos receptores [45]. En la fagocitosis convencional los fagosomas se asocian a los lisosomas para degradar su contenido, las micobacterias bloquean este proceso de fusión, el cual es un evento activo que depende de que las bacterias estén vivas puesto que bacterias muertas fagocitadas rápidamente ingresan al compartimento lisosomal [44]. Además de modificar la morfología, las vacuolas en donde radican las bacterias retienen marcadores endosomales tempranos como las GTPasas Rab5 y Rab14 y no expresan los marcadores tardíos como la molécula Rab7, lo cual indica bloqueo de la maduración endosomal [46,47]. Otra característica del endosoma micobacteriano es su acidez limitada [48]. Normalmente el material transportado en los lisosomas tiene un medio ácido debido a la acción en el endosoma tardío de la bomba de protones dependiente de ATP (V-ATPasa), se ha sugerido que esta reducción de la acidificación lisosomal es el resultado de una significativa reducción de la V-ATPasa en el fagosoma micobacteriano (43). Otra propiedad que tiene el fagosoma micobacteriano es la incapacidad de asociarse con la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS) [49].

La incapacidad de madurar del fagosoma micobacteriano se le ha atribuido a la retención activa de una proteína fagosomal conocida como TACO (proteína de cubierta triptófano aspártico) [50]. Es también importante que TACO se asocie a la membrana plasmática de los macrófagos a través del colesterol, un proceso que asocia a estas dos moléculas en los mecanismos de sobrevivencia de la micobacteria [51].

La inhibición de la maduración fagosómica por la micobacteria puede ser revertida por citocinas como el IFN γ y TNF α , los cuales también estimulan mecanismos microbicidas como la producción de radicales libres de oxígeno y óxido nítrico [52]. El papel protector del óxido nítrico se ha demostrado en diversos modelos murinos [53, 54] y una función similar se ha sugerido en los humanos [55]. En comparación, la participación de los radicales libres de oxígeno no se ha definido completamente, aunque se sabe que el peróxido de hidrógeno es producido por macrófagos activados por citocinas y que tiene efecto bactericida. También se ha mostrado que moléculas del Mtb como el glicolípido fenólico y lipoarabinomana son atrapadores de radicales libres de oxígeno [56].

Activación de la respuesta Th2

En los inicios de la década de los años 90 del siglo pasado, algunos investigadores reportaron un incremento de la respuesta Th-2, en particular IL-4, en pacientes con tuberculosis avanzada [57, 58]. Posteriormente otros autores no hicieron la misma observación y esto quedó en controversia [59]. Estudios posteriores indicaron que esta divergencia pudo haber sido consecuencia de problemas técnicos [60] y actualmente existen evidencias contundentes que demuestran la existencia de la respuesta Th2 en TB [61-64]. Es interesante que los niveles de IL-4 tienden a ser mayores en pacientes que viven en la franja ecuatorial, posiblemente por el clima cálido y húmedo que favorece el crecimiento de micobacterias saprofitas y la coexistencia de

infestación por helmintos, así como el probable mayor inoculo que estos pacientes reciben como consecuencia de la existencia de enfermos con formas mas graves de la enfermedad debido a la menor cobertura y educación médica de la población [65]. Los pacientes con TB avanzada tienen varias manifestaciones de alta actividad de IL-4 como un alto nivel de anticuerpos de clase IgE en contra de antígenos micobacterianos [66], anticuerpos contra cardiolipina [67] y alta expresión de la molécula de membrana DC-SIGN en células dendríticas [68]. La IL-4 se ha detectado en las lesiones tuberculosas pulmonares por hibridación in-situ [69]. El RNA mensajero de IL-4 y células T con IL-4 se encuentran incrementados en la tuberculosis pulmonar humana, lo cual correlaciona significativamente con los niveles de IgE sérica y la extensión de las lesiones cavitadas [61, 62, 64]. Se ha demostrado que las células CD8 son también una fuente de IL-4 y su cantidad correlaciona con la cavitación pulmonar [62]. La existencia de alta concentración de IL-4 en los estadios avanzados de la enfermedad tiene una participación patogénica directa debido a que antagoniza a la respuesta protectora Th1 [70].

Anormalidades similares se han observado en los pulmones de ratones Balb/c experimentalmente infectados con una dosis alta de Mtb cepa H37Rv [71, 72]. En este modelo existe una fase inicial de resistencia parcial dominada por una respuesta predominante Th1 y macrófagos activados que producen TNF α y expresan iNOS. La fase progresiva de la enfermedad inicia un mes después de la infección y se caracteriza por una disminución acentuada de células que expresan IFN γ , IL-2, TNF α e iNOS, en coexistencia con daño tisular progresivo (neumonía), fibrosis intersticial extensa, abundantes bacterias y elevada producción de IL-4 y otras citocinas inmunosupresoras como el factor de transformación tumoral beta (TGF β) el cual es producido por un tipo especial de macrófago con abundantes vacuolas citoplásmicas (macrófago vacuolado o espumoso) [73]. Es importante destacar que este modelo experimental se asemeja al tipo de tuberculosis observada en pacientes de países en vías de desarrollo la cual es adquirida por un inoculo grande y muestra una tendencia a producir niveles altos de IL-4 [74]. Por lo tanto, este modelo murino se puede considerar como similar a la tuberculosis humana progresiva caracterizada por una alta concentración de IL4 y TGF β . El sesgo a la respuesta Th2 que se observa en los ratones BALB/c y en menor grado en los enfermos humanos, no existe en el modelo experimental establecido en ratones C57Bl infectado con dosis bajas en aerosol y que se caracteriza por granulomas grandes con extensa consolidación pulmonar y una larga y sostenida respuesta Th1 [75].

Nosotros hemos apoyado la hipótesis de que la respuesta Th2 presente en la tuberculosis murina y humana es más intensa cuando la enfermedad es más grave. Cuales son entonces las causas de este desbalance inmunológico y cual es la participación de otros factores que permiten la progresión de la enfermedad?. Se intentara dar respuesta a estas preguntas en las secciones siguientes, pero seguramente que existen muchos otros factores participantes que aun no conocemos y su caracterización contribuirá significativamente al conocimiento de la inmunopatología y eventual control de esta importante enfermedad infecciosa.

Carga antigénica y micobacterias saprofitas ambientales

El aumento de la carga antigénica es claramente un factor participante, como lo muestra la relación entre el balance Th1/Th2 y la dosis de antígenos particulados como las micobacterias [72] o leishmania [76]. Cargas antigénicas bajas inducen respuesta Th1, mientras que una alta concentración de antígenos activa eficientemente la respuesta Th2. El modelo experimental en ratones Balb/c antes descrito recapitula muy bien este concepto, respuestas mixtas Th1/Th2 existen durante la fase avanzada de la enfermedad y contribuye en reducir la inmuno-protección [72]. Más aun, cuando ratones Balb/c se preinmunizan con una dosis baja de una micobacteria saprofita muy antigénica (*M. vaccae*), la infección con Mtb H37Rv induce una rápida e intensa respuesta Th1 que protege parcialmente el desarrollo de enfermedad progresiva. En comparación, cuando los animales son preinmunizados con una dosis alta, diez veces mayor del mismo preparado bacteriano, los animales rápidamente establecen una respuesta mixta Th1/Th2

que facilita la progresión de la enfermedad y muerte [76]. Por lo tanto, la exposición a micobacterias saprofitas puede contribuir a determinar la resistencia o susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, lo cual parece depender de la cantidad de bacterias ambientales con las que se confronta el sujeto. La naturaleza, ruta y dosis de la exposición a las bacterias saprofitas depende del lugar y la forma de vida del individuo, debido a que las micobacterias saprofitas no son parte de la flora bacteriana de los seres humanos. Esta inmunización natural con micobacterias saprofitas puede entonces contribuir en la protección o susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad y también puede afectar la protección conferida por la vacuna BCG en diferentes partes del mundo [76].

El balance mixto Th1/Th2 parece estar relacionado al daño tisular producido por la respuesta inmunológica en la tuberculosis. Diversos signos clínicos como fiebre, pérdida de peso y daño tisular que expresan los pacientes con TB, recuerdan los efectos del TNF α . Las evidencias que prueban que estos signos pueden ser producidos por esta citocina han sido aportadas por estudios en los cuales la talidomida, una droga que acorta el tiempo de vida media del RNA mensajero de TNF α [77], se administra a pacientes tuberculosos y produce una significativa reducción de la sintomatología con ganancia de peso [78]. Por lo tanto el TNF α tiene una participación paradójica en la inmunopatología de la tuberculosis, por un lado tiene un papel fundamental en la protección en contra de Mtb y por el otro contribuye al daño tisular observado en la enfermedad. Esta discrepancia parece depender del balance citocínico de la inmunidad celular como se observó en los experimentos antes descritos con *M. vaccae*, pues si este preparado bacteriano se administra en una dosis baja a ratones Balb/c y dos meses después se infecta a los animales con una dosis alta por vía intratraqueal con Mtb H37Rv, los animales producen una gran cantidad de IFN γ como consecuencia de la activación preferencial Th1 en coexistencia con una elevada respuesta de hipersensibilidad tardía cutánea (DTH) en el cojinete plantar y si en este sitio 24 h después se administra TNF α recombinante no se produce más inflamación. En comparación, si los ratones son inmunizados con una dosis 100 veces mayor del mismo preparado de *M. vaccae*, se induce una respuesta mixta Th1/Th2 con una alta producción de IL4 lo cual abate la DTH y si a estos animales se les inyecta en el cojinete plantar TNF α se produce inflamación extensa con necrosis masiva [76]. Parece entonces que el TNF α liberado en un sitio en donde existe una respuesta predominantemente Th1 actúa como inductor de la activación macrófaga, pero cuando el TNF α se libera en un sitio con balance mixto Th1/Th2 con una alta concentración de IL4, el TNF α produce entonces extenso daño tisular. Esta respuesta se asemeja al fenómeno de Koch y posteriormente fue confirmada en ratones con eliminación de los genes que codifican IL4 (Knockout), los cuales no solo exhibieron menos carga bacilar que los ratones silvestres, sino que durante la enfermedad avanzada también mostraron mayor DTH sin toxicidad inducida por el TNF α [79].

Producción alta de prostaglandinas

Otro factor que afecta importantemente la inmunidad protectora en la TB es la producción de prostaglandinas. Las prostaglandinas son potentes mediadores de la inflamación y en particular la prostaglandina E2 (PGE-2) en altas concentraciones es inmunosupresor de las células T [80]. En el modelo de tuberculosis en ratones Balb/c, la concentración pulmonar de PGE-2 se mantiene en concentraciones bajas y estables durante la fase temprana y si los ratones se tratan con ácido niflúmico, una droga que bloquea específicamente a la enzima ciclooxigenasa 2 elemento crucial en la síntesis inducida de PG; los pulmones de los animales de experimentación muestran mucha inflamación con elevada expresión de TNF α , IL-1 α e IFN γ pero con disminución acentuada de la expresión de iNOS, lo cual coexiste con elevada carga bacilar. En comparación, durante la fase progresiva o avanzada de la enfermedad, los macrófagos vacuolados de las áreas neumónicas muestran intensa positividad para la PGE-2 por inmunohistoquímica y la concentración de esta es 4 veces mayor que en la fase temprana y cuando la producción de PG se suprime por la administración de ácido niflúmico, se disminuye significativamente la carga bacilar y el daño tisular en coexistencia con el desarrollo de

granulomas mas grandes y mayor expresión de IFN γ , TNF α e iNOS. Por lo tanto, PGE-2 participa de manera significativa en la inmunopatología de la TB de forma ambivalente dependiendo de sus concentraciones. Durante la fase temprana de la infección existe baja producción de PGE-2 con lo que contribuye a una alta expresión de iNOS y en consecuencia control eficiente del crecimiento bacteriano, mientras que en la fase tardía de la enfermedad las altas concentraciones de PGE-2 suprimen la inmunidad mediada por células, contribuyendo así con la progresión de la enfermedad [81].

Producción elevada de factor de transformación tumoral beta (TGF- β)

La producción excesiva de TGF β también participa de manera importante en la inmunopatología de la TB humana y experimental. Las células sanguíneas mononucleares de pacientes con TB producen gran cantidad de TGF β y esta citocina se encuentra también en altas concentraciones en las lesiones pulmonares [82]. Las concentraciones séricas son muy altas en pacientes con TB avanzada [83]. El componente lipídico distintivo de la pared bacteriana lipoarabinomannano-manosa es un potente inductor de la producción de TGF β por macrófagos [84]. Los macrófagos alveolares y monocitos producen y secretan TGF β activo como respuesta a la estimulación con la micobacteria [85]. Varios reportes indican que el TGF β puede suprimir la inmunidad protectora en contra del Mtb in-vivo, por ejemplo en un modelo murino TGF β suprime la inmunidad protectora y al administrar el péptido asociado a latencia, un modulador natural de la función del TGF β , se disminuye el crecimiento de la bacteria BCG en los pulmones y se incrementa la producción de IFN γ [86]. Otra evidencia es el incremento significativo en la carga bacteriana pulmonar cuando a cobayos tuberculosos se les trata con TGF β [87]. En nuestro modelo experimental en ratones Balb/c , el TGF β se produce en gran cantidad durante la fase avanzada de la enfermedad y cuando la actividad de este se bloquea con la administración del receptor soluble tipo III o betaglicano se incrementa significativamente la expresión de TNF α , IFN γ e IL-2 y se disminuye la expresión de IL-4 en coexistencia con una disminución significativa de la carga bacilar, pero al mismo tiempo se produce más inflamación y consolidación pulmonar [88]. Por lo tanto, el TGF β es un eficiente agente anti-inflamatorio supresor de la inmunidad celular que previene el daño tisular por inflamación excesiva.

La fibrosis es una causa importante de disfunción pulmonar permanente en la TB humana, la cual es en buena parte debida al exceso de producción del TGF β que tiene actividad profibrogénica y a la respuesta Th-2. Es interesante que la fibrosis pulmonar en la esclerosis sistémica progresiva se relaciona a una alta producción de IL-4 por linfocitos CD8+ [89]. Al infectar con Mtb ratones con eliminación de los genes que codifican IL-4 (knockout) se produce una significativa reducción de la producción de TGF β durante la fase progresiva de la enfermedad, en coexistencia con menos fibrosis y carga bacteriana pulmonar [79], lo cual confirma que las citocinas Th-2 contribuyen al desarrollo de la fibrosis probablemente por inducción en la producción de TGF β [90].

Activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)

Los esteroides adrenales pueden también contribuir a la disfunción de la respuesta protectora Th-1 en TB. La exposición al estrés asociado a la desnutrición como sucede con los refugiados de países en guerra o el ganado que es hacinado durante largos viajes, son causas frecuentes de reactivación de infección latente en TB, debido a que en estas circunstancia existe activación del eje HHA y en consecuencia elevada secreción de cortisona [91-93], lo cual reduce la activación de macrófagos y células Th-1 [94], al mismo tiempo que sinergiza con algunas actividades de las células Th2 [95]. Los pacientes tuberculosos pierden el ritmo circadiano en la producción de los glucocorticoides, exponiendo a sus linfocitos a niveles constantes y altos de cortisol [96], mientras que la producción total del cortisol y andrógenos esta disminuida en los pacientes tuberculosos [97]. El cortisol se degrada y pierde su actividad al convertirse en

cortisona, actividad que es mediada por la enzima 11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa. De manera interesante, en los pacientes tuberculosos este proceso metabólico esta disminuido particularmente en el pulmón, con lo cual los niveles séricos de cortisol en los pacientes es normal y en el pulmón las concentraciones de esta hormona están elevadas, lo cual contribuye a suprimir la inflamación pero al mismo tiempo la inmunidad protectora Th1, favoreciendo así la progresión de la enfermedad [98]. En nuestro modelo murino, la producción elevada de TNF α por los macrófagos activados en los granulomas maduros de los pulmones en el día 21 post-infección, activa a las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo las cuales en consecuencia producen el factor liberador de corticotrofina, éste a su vez induce la secreción de corticotrofina o ACTH por la pituitaria y esta hormona estimula la corteza suprarrenal provocando una gran liberación de cortisol, lo cual es tan intenso que las adrenales duplican su peso y la corteza adrenal sufre hiperplasia difusa [99]. La elevada producción de corticosterona, equivalente al cortisol humano, contribuye a que la respuesta de inmunidad celular sea preferencialmente de tipo Th2, la cual antagoniza a la respuesta protectora Th-1 contribuyendo así a la progresión de la enfermedad. Seguramente que esta intensa activación del eje HHA es otro mecanismo que tiene el objetivo de disminuir el exceso de inflamación que afecta la estructura y función pulmonar, pero al mismo tiempo desactiva a la respuesta pro-inflamatoria Th-1 que es protectora en TB, con lo cual se facilita el crecimiento bacteriano y la progresión de la enfermedad. Es interesante que durante la fase avanzada de la enfermedad en nuestro modelo murino, se produce atrofia adrenal [99], situación similar a la disminución de la reserva adrenal observada en pacientes con TB grave que mueren súbitamente durante el tratamiento sin causa aparente [100, 101]. Experimentos recientes in vitro han mostrado que es el TGF β uno de los agentes principales que producen muerte por apoptosis a las células de la corteza suprarrenal, lo cual también explicaría las adrenales atroficas sin tuberculosis que se observan en algunos sujetos que fallecieron por TB. El TNF α y la IL-1 son "tóxicas" en los ratones adrenalectomizados [102, 103]. Por lo tanto la atrofia adrenal podría tener alguna participación en el fenómeno de Koch experimental que se ha reportado en nuestro modelo murino [99]. Es importante tener en cuenta que la función del cortisol en el tejido linfoide como en los ganglios linfáticos, es regulado por la producción local de metabolitos de la hormona dehidroepiandrosterona sulfatada [95], y que este esteroide androgénico tiene una eficiente actividad anti-glucocorticoide promoviendo la respuesta Th1 [95]. De hecho la administración de este metabolito esteroideo o análogos sintéticos que carecen de actividad androgénica produce una eficiente actividad promotora Th-1 constituyéndose en una forma nueva eficiente de inmunoterapia [104].

Apoptosis selectiva de linfocitos Th1 y resistencia a la apoptosis de macrófagos activados

Otro mecanismo que participa en la disminución de la actividad Th1 durante la fase progresiva de la enfermedad en el modelo de ratón Balb/c es la apoptosis selectiva de las células Th-1, la cual puede aparentemente ser producida por mediación del sistema FAS/ligando de Fas y participación de macrófagos espumosos [105]. Este tipo de células predominan en la fase avanzada de la enfermedad, su citoplasma tiene abundantes vacuolas que contienen material lípido de la bacteria como el lipoarabinomana. Los macrófagos vacuolados muestran escasa inmunotinción para los factores protectores TNF e iNOS, pero exhiben intensa inmunotinción para el TGF β [73, 106] y también para la molécula anti-apoptósica Bcl-2. Por lo tanto, estas células tienen una larga vida media lo que permite albergar bacterias por largo plazo, además de que son fuente importante de factores inmunosupresores que contribuyen con la progresión de la enfermedad. Resultados recientes de nuestro grupo muestran que uno de los factores más importantes en la sobreexpresión de la molécula antiapoptósica Bcl-2 es la hipoxia, a través de la sobreexpresión del factor transcripcional HIF (hipoxia inducer factor). Es interesante que al bloquear farmacológicamente la activación de este factor se induce extensa apoptosis de los macrófagos vacuolados con lo cual la carga bacilar disminuye y se restituye la actividad inmunológica protectora (artículo en preparación).

Retraso de la activación de células dendríticas

Las células dendríticas (CD) son reclutadas de la sangre y el tejido pulmonar y contribuyen a la inmunidad protectora en la infección por Mtb dado que estas se incrementan en las lesiones [107, 108]. Las CD reconocen, capturan y procesan antígenos presentándolos en un contexto de proteínas de clase II del MHC y también por el sistema CD1 [109, 110]. Las CD unen antígenos por el receptor tipo C de lectinas como el DC-SIGN [111, 112] y las CD derivadas de monocitos expresan receptores tipo Toll TLR-2 y 4 [113, 114]. Una vez que los antígenos han sido capturados e internalizados, las CD maduran lo cual se manifiesta por un aumento en la síntesis de proteínas clase I y II del MHC y por la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 [115], así como por la producción de IL-12 (116). Después de madurar, las CD emigran a los ganglios linfáticos. Cuando las CD se derivan de monocitos y se infectan con Mtb, su capacidad de presentar antígenos lipídicos se afecta y la expresión de la molécula CD-1 disminuye [117]. Componentes de la pared bacteriana inhiben la maduración fenotípica de las CD inducida por lipopolisacárido. De hecho, cuando se compara con antígenos solubles o con bacterias no virulentas, Mtb induce un largo retraso en la activación de las CD en el pulmón y en los ganglios linfáticos mediastinales (dos semanas después) en nuestro modelo experimental murino [107, 108]. En el mismo modelo durante la fase progresiva de la enfermedad las CD disminuyen progresivamente en pulmones y ganglios linfáticos mediastinales.

Participación de células T reguladoras

Las células T reguladoras naturales del fenotipo CD4+, CD25+, Foxp3 representan el 5-10% de las células leucocitarias circulantes en el hombre y murinos sanos [118, 119]. Estas células determinan la magnitud de la respuesta inmunológica. El balance entre las diferentes poblaciones celulares T es controlada por diversos subtipos de células T reguladoras, incluida la regulación Th1/Th2. Los pacientes con TB activa tienen una población expandida de células T regulatorias en la sangre circulante y en el sitio de la infección [120, 121], y al parecer estas células pueden participar en la supresión de las células Th-1 y de esta forma favorecer la progresión de la enfermedad. En nuestro modelo experimental murino, estas células se incrementan durante la fase avanzada de la enfermedad, lo mismo que macrófagos productores de las enzimas hemoxigenasa e indolamina 2-3 desoxigenasa que también tienen actividad supresora [122].

Incremento en la producción de proteínas de fase aguda, participación de la glicoproteína ácida alfa-1

La lesión tisular inducida por trauma o infección, desencadena una compleja cascada de reacciones cuya finalidad es evitar o disminuir la destrucción tisular, aislar y eliminar el agente agresor, así como activar el proceso de reparación tisular [123]. Este complejo proceso es conocido con el término de inflamación y una de sus más tempranas manifestaciones es la denominada reacción de fase aguda (RFA). Uno de los componentes más importantes y distintivos de la RFA es el cambio en la concentración de varios reactantes en el plasma, conocidos en general como proteínas de fase aguda (PFA) [123]. Las PFA son una familia de aproximadamente 30 proteínas plasmáticas principalmente producidas por el hígado después de la activación genética inducida por las citocinas proinflamatorias TNF α e IL-6 [124]. Además de detoxificar sustancias nocivas, el hígado contribuye con factores importantes para protección inmediata del tejido lesionado. Muchos de estos factores son sustancias esenciales durante los estadios críticos del estrés y también contribuyen con la reparación tisular [123], estas son justamente algunas de las funciones de las PFA [123, 124]. La glicoproteína ácida alfa-1 (GPA) es una de las principales PFA, su expresión es inducida intensamente en el hígado durante el curso de la enfermedad en nuestro modelo murino de tuberculosis [125]. Es interesante que la

GPA es también producida en el pulmón en el mismo modelo experimental, siendo los macrófagos alveolares activados y los neumocitos tipo II las fuentes celulares de esta proteína durante la fase temprana de la enfermedad y los macrófagos vacuolados durante la fase tardía, cuando la concentración de esta proteína es diez veces mayor. Cuando la GPA es bloqueada en su actividad durante la fase tardía en el mismo modelo, se reactiva la expresión de los factores protectores IFN γ , TNF α e iNOS en coexistencia con una disminución significativa de la carga bacilar y el daño tisular. Se concluye que la GPA se produce en el pulmón durante la tuberculosis pulmonar progresiva en el ratón y tiene actividades inmunosupresoras de la inmunidad celular facilitando así el crecimiento bacteriano y la progresión de la enfermedad [126].

Disminución de la producción de beta-defensinas

Como se mencionó anteriormente, un importante componente de la respuesta inmune innata son las defensinas [35], proteínas de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana y también con actividad quimiotáctica y activadora de las células T operando a través del receptor CCR6. El epitelio de las vías respiratorias es una fuente importante de defensinas beta, las cuales son de 4 tipos: la beta 1 es constitutiva, mientras que la beta 2 y 3 son inducibles por IL-1, TNF y también por el reconocimiento de moléculas de hongos y bacterias por TLRs. En nuestro modelo murino de tuberculosis, existe una gran expresión de beta-defensinas 3 y 4 en las células del epitelio bronquial durante la fase temprana, lo cual coexiste con un eficiente control del crecimiento bacteriano. Posteriormente durante la fase progresiva hay acentuada supresión de su expresión [37]. Recientemente informamos sobre una exitosa forma de inmunoterapia consistente en inducir la expresión de beta-defensinas durante la fase avanzada de la enfermedad con inductores como la isoleucina, tanto en tuberculosis drogo-sensible como drogo-resistente [127].

Conclusiones

Durante la tuberculosis activa existen diversos factores inmunopatológicos que participan suprimiendo la inmunidad protectora (Tabla 1). Muchos de estos factores son también eficientes mecanismos antiinflamatorios que están encaminados a proteger del daño tisular producido por inflamación excesiva, pero al mismo tiempo facilitan el crecimiento bacteriano y la progresión de la enfermedad (Figura 1). Cuando menos a nivel experimental es posible manipular estos factores inmunopatológicos, permitiendo un mejor control de la enfermedad o mejorando la quimioterapia convencional [128]. Esta es la base racional de la inmunoterapia, la cual puede contribuir significativamente en el control de esta importante enfermedad infecciosa.

Tabla 1. Factores participantes en la progresión de la tuberculosis pulmonar

Carga antigénica elevada
Emergencia de linfocitos Th-2
Activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
Hipersecreción de prostaglandina E2
Elevada producción de TGF β
Retraso de la activación de células dendríticas
Resistencia a la apoptosis de macrófagos infectados
Apoptosis selectiva de linfocitos Th-1
Producción local elevada de glicoproteína ácida alfa-1
Disminución en la producción de defensinas beta

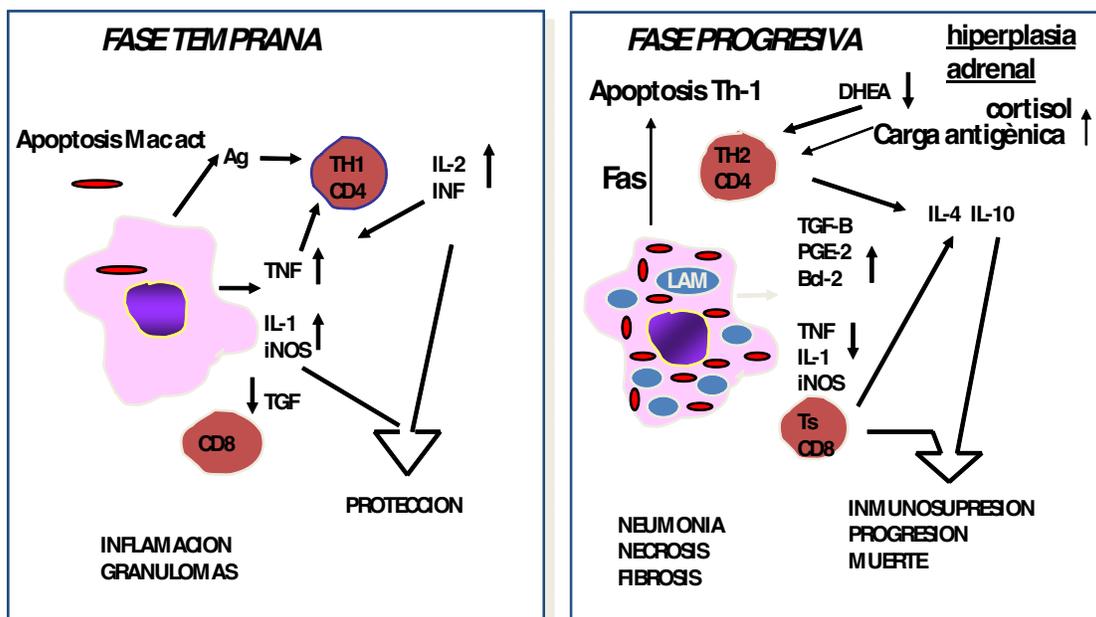


Figura 1. Eventos inmunológicos importantes en el control y progresión de la tuberculosis experimental. Durante la fase temprana de la infección predominan los eventos protectores, esencialmente representados por macrófagos activados, linfocitos Th-1 y CD8 cuyas interleucinas como el interferon gamma y el factor de necrosis tumoral controlan el crecimiento bacteriano. Durante la fase progresiva de la enfermedad diversos factores inmunológicos contribuyen a ésta, como lo son la emergencia de linfocitos Th2 y macrófagos con capacidad de producir moléculas inmunosupresoras como el factor de transformación tumoral beta o prostaglandina E2, así como la inducción de apoptosis selectiva de células Th-1, todo esto permite la proliferación bacteriana y daño tisular extenso.

Referencias

1. Rook, G.A.W. y Hernandez-Pando, R. (1996) *Ann. Rev. Microbiol.* **50**, 259-84
2. Schlesinger, L.S., Bellinger-Kawahara, C.G., Payne, N.R., y Horwitz, M.A. (1990) *J. Immunol.* **144**, 2771-80
3. Schlesinger, L.S. (1993) *J. Immunol.* **150**, 2920-30
4. Zimmerli, S., Edwards, S. y Ernst, J.D. (1996) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **15**, 760-70
5. Peterson, P.K., Gekker, G. y Hu, S. (1995) *Infect. Immun.* **63**, 1598-602
6. Randhawa, A.K., Ziltener, H.J., Merzaban, J.S. y Stokes, R.W. (2005) *J. Immunol.* **175**, 1805-12
7. Muller, I., Cobbold, S.P., Waldmann, H. y Kaufmann, S.H. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 2037-41
8. Caruso, A.M., Serbina, N., Klein, E., Triebold, K., Bloom, B.R. y Flynn, J.L. (1999) *J. Immunol.* **162**, 5407-16
9. Jouanguy, E., Doffinger, R., Dupuis, S., Pallier, A., Altare, F. y Casanova, J.L. (1999) *Curr Opin. Immunol.* **11**, 346-51

10. Alcais, A., Fieschi, C., Abel, L. y Casanova, J.L. (2005) *J. Exp. Med.* **202**, 1617-21
11. Scanga, C.A., Mohan, V.P. y Yu, K. (2000) *J. Exp. Med.* **192**, 347-58
12. Oddo, M., Renno, T., Attinger, A., Bakker, T., MacDonald, H.R. y Meylan, P.R. (1998) *J. Immunol.* **160**, 5448-54
13. Serbina, N.V., Lazarevic, V. y Flynn, J.L. (2001) *J. Immunol.* **167**, 6991-7000
14. Behar, S.M., Dascher, C.C., Grusby, M.J., Wang, C.R. y Brenner, M.B. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 1973-80
15. Stenger, S., Hanson, D.A. y Teitelbaum, R. (1998) *Science* **282**, 121-125
16. Serbina, N.V. y Flynn, J.L. (1999) *Infect. Immun.* **67**, 3980-8
17. Stenger, S., Mazzaccaro, R.J. y Uyemura, K. (1997) *Science* **276**, 1684-1687
18. Teitelbaum, R., Glatman-Freedman, A. y Chen, B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15688-93
19. Williams, A., Reljic, R. y Naylor, I. (2004) *Immunology* **111**, 328-33
20. de Valliere, S., Abate, G., Blazevic, A., Heuertz, R.M. y Hoft, D.F. (2005) *Infect. Immun.* **73**, 6711-20
21. Boyton, R.J. y Openshaw, P.J. (2002) *Br. Med. Bull.* **61**, 1-12
22. Williams, A., Reijic, R. y Naylor, I. (2004) *Immunology* **111**, 328-333
23. Reljic, R., Clark, S.O., Williams, A. et al., (2006) *Clin. Exp. Immunol.* **143**, 467-473
24. Hernandez-Pando, R., Jeyanathan, M. y Mengistu, G., (2000) *Lancet* **356**, 2133-8
25. Bermudez, L.E. y Goodman, J. (1996) *Infect. Immun.* **64**, 1400-6
26. Wickremasinghe, M.I., Thomas, L.H. y Friedland, J.S. (1999) *J. Immunol.* **163**, 3936-47
27. Diamond, G. y Bevins, C.L. (1998) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **88**, 221-5
28. Bals, R. (2000) *Respir. Res.* **1**, 141-50
29. Selsted, M.E., Szklarek, D., Ganz, T. y Lehrer, R.I. (1985) *Infect. Immun.* **49**, 202-6
30. Daher, K.A., Selsted, M.E. y Lehrer, R.I. (1986) *J. Virol.* **60**, 1068-74
31. Hoover, D.M., Rajashankar, K.R. y Blumenthal, R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 32911-8
32. Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K. y Ganz, T. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 105-28
33. Miyakawa, Y., Ratnakar, P. y Rao, A.G. (1996;) *Infect. Immun.* **64**, 926-32
34. Ogata, K., Linzer, B.A., Zuberi, R.I., Ganz, T., Lehrer, R.I. y Catanzaro, A. (1992) *Infect. Immun.* **60**, 4720-5
35. Ganz, T. (2003) *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 710-20
36. Rivas-Santiago, B., Schwander, S.K. y Sarabia, C. (2005) *Infect. Immun.* **73**, 4505-11
37. Rivas-Santiago, B., Sada, E., Tsutsumi, V., Aguilar-Leon, D., Contreras, J.L. y Hernandez-Pando, R. (2006) *J. Infect. Dis.* **194**, 697-701
38. Bals, R., Wang, X. y Wu, Z. (1998) *J. Clin. Invest.* **102**, 874-80
39. Kaiser V, Diamond G. (2000) *J Leukoc Biol.* **68**: 779-84.
40. Ashitani, J., Mukae, H., Hiratsuka, T., Nakazato, M., Kumamoto, K., Matsukura, S. (2001) *Chest* **119**, 1131-7
41. Kisich, K.O., Heifets, L., Higgins, M. y Diamond, G. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 2692-9
42. Sharma, S., Verma, I. y Khuller, G.K. (2001) *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**, 639-40
43. Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H. y Chakraborty, P. (1994) *Science* **263**, 678-81
44. Armstrong, J.A. y Hart, P.D. (1975) *J. Exp. Med.* **142**, 1-16
45. Hasan, Z., Schlax, C. y Kuhn, L. (1997) *Mol. Microbiol.* **24**, 545-53
46. Via, L.E., Deretic, D., Ulmer, L.J., Hibler, N.S., Huber, L.A. y Deretic, V. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13326-31
47. Kyei, G.B., Vergine, I. y Chua, J. (2006) *EMBO J.* **25**, 5250-9
48. Crowle, A.J., Dahl, R., Ross, E. y May, M.H. (1991) *Infect. Immun.* **59**, 1823-31
49. Miller, B.H., Fratti, R.A. y Poschet, J.F. (2004) *Infect. Immun.* **72**, 2872-8
50. Ferrari, G., Langen, H., Naito, M. y Pieters, J. (1999) *Cell* **97**, 435-47
51. Gatfield, J. y Pieters, J. (2000) *Science* **288**, 1647-50
52. Chan, X., Xing, Y., Magliozzo, R.S. y Bloom, B.R. (1992) *J. Exp. Med.* **175**, 1111-22
53. Mac, J.D., North, R., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K. y Nathan, C.F. (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**, 5243-8

54. Flynn, J.L., Scanga, C.A., Tanaka, K.E. y Chan, J. (1998) *J. Immunol.* **160**, 1796-803
55. Nicholson, S., Bonechini-Almeida, M.G. y Lapa, e Silva. (1996). *J. Exp. Med.* **183**, 2293-302
56. Chan, J., Fan, X.D., Hunter, S.W., Brennan, P. y Bloom, B.R. (1991) *Infect. Immun.* **59**, 1755-61
57. Schauf, V., Rom, W.N. y Smith, K.A. (1993) *J. Infect. Dis.* **168**, 1056-9
58. Sanchez, F.O., Rodriguez, J.I., Agudelo, G. y Garcia, L.F. (1994) *Infect. Immun.* **62**, 5673-8
59. Lin, Y., Zhang, M., Hofman, F.M., Gong, J. y Barnes, P.F. (1996) *Infect. Immun.* **64**, 1351-6
60. Rook, G.A.W., Hernandez-Pando, R., Dheda, K. y Teng, Seah. G. (2004) *Trends. Immunol.* **25**, 483-8
61. Seah, G.T., Scott, G.M. y Rook, G.A. (2000) *J. Infect. Dis.* **181**, 385-9
62. van Crevel, R., Karyadi, E. y Preyers, F. (2000) *J. Infect. Dis.* **181**, 1194-7
63. Marchant, A., Amedei, A. y Azzurri, A. (2001) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 187-94
64. Lienhardt, C., Azzurri, A. y Amedei, A. (2002) *Eur. J. Immunol.* **32**, 1605-13
65. Malhotra, I., Mungai, P. y Wamachi, A. (1999) *J. Immunol.* **162**, 6843-6848
66. Yong, A.J., Grange, J.M., Tee, R.D. et al., (1989) *Tubercle* **70**, 273-279
67. Fischer, K., Collins, H., Taniguchi, M., Kaufmann, S.H. y Schaible, U.E. (2002) *J. Immunol.* **168**, 2689-94
68. Relloso, M., Puig-Kroger, A. y Pello, O.M. (2002) *J. Immunol.* **168**, 2634-43
69. Fendhalls, G. (2000) *Infect. Immun.* **68**, 2827-36
70. Biedermann, T., Zimmermann, S. y Himmelrich, H. (2001) *Nat. Immunol.* **2**, 1054-60
71. Hernandez-Pando, R., Orozco, H. y Sampieri, A. (1996) *Immunology* **89**, 26-33
72. Hernandez-Pando, R., Pavon, L., Arriaga, K., Orozco, H., Madrid-Marina, V. y Rook, G. (1997) *Infect. Immun.* **5**, 3317-27
73. Hernandez-Pando, R., Orozco, H., Arriaga, K., Sampieri, A., Larriva-Sahd, J. y Madrid-Marina, V. (1997) *Immunology* **90**, 607-17
74. Rook, G.A.W., Deehda, K. y Zumla, A. (2005) *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 661-7
75. Rook, G.A., Hernández-Pando, R. y Zumla, A. (2009) *J. Infect. Dis.* **199**, 613-8
76. Bretscher, P., Wei, G., Menon, J.N. y Bielefeldt-Ohmann, P. (1992) *Science* **257**, 539-42
77. Moreira, A.L., Sampaio, E.P., Zmuidzinass, A., Frindt, P., Smith, K.A. y Kaplan, G. (1993) *J. Exp. Med.* **177**, 1675-80
78. Kaplan, G. (1994) *Immunobiology* **191**, 564-68
79. Hernández-Pando, R., Aguilar, L.D., García, H.L.M., Orozco, E.H. y Rook, G.A.W. (2004) *Eur. J. Immunol.* **34**, 174-183
80. Phipps, R.P., Stein, S.H. y Roper, R.L. (1991) *Immunol. Today* **12**, 349-52
81. Rangel, M.J., Estrada-García, I., García, H.M.L., Aguilar, L.D., Marquez, V.R. y Hernández-Pando, R. (2002) *Immunology* **106**, 257-66
82. Toossi, Z., Gogate, P., Shiratsuchi, H., Young, T. y Ellner, J.J. (1995) *J. Immunol.* **154**, 465-73
83. Fiorenza, G., Rateni, L., Farroni, M.A., Bogue, C. y Dlugovitzky, D.G. (2005) *Immunol. Lett.* **98**, 45-8
84. Dahl, K.E., Shiratsuchi, H., Hamilton, B.D., Ellner, J.J. y Toossi, Z. (1996) *Infect. Immun.* **64**, 399-405
85. Aung, H., Wu, M., Johnson, J.L., Hirsch, C.S. y Toossi, Z. (2005) *Scand. J. Immunol.* **61**, 558-65
86. Wilkinson, K.A., Martin, T.D. y Reba, S.M. (2000) *Infect. Immun.* **68**, 6505-8
87. Dai, G. y McMurray, D.N. (1999) *Tuber Lung Dis.* **79**, 207-14
88. Hernandez-Pando, R., Orozco-Esteves, H. y Maldonado, H.A. (2006) *Clin. Exp. Immunol.* **144**, 264-72
89. Atamas, S.P., Yurovski, V.V. y Wise, R. (1999) *Arthritis Rheum.* **42**, 1168-79
90. Lee, C.G., Homer, R. y Zhu, Z. (2001) *J. Exp. Med.* **194**, 809-21
91. Spence, D.P., Hotchkins, J., Williams, C.S. y Davies, P.D. (1993) *Br. Med. J.* **307**, 759-761
92. Brown, D.H., LaFuse, W. y Zwilling, B.S. (1995) *Infect. Immun.* **63**, 2983-2988
93. Tobach, E. y Bloch, H. (1956) *Am. J. Physiol.* **187**, 399-402
94. Daynes, R.A., Meikle, A.W. y Araneo, B.A. (1991) *Res. Immunol.* **142**, 40-45
95. Rook, G.A.W., Hernández-Pando, R. y Lightman, S. (1994) *Immunology Today* **15**, 301-303
96. Sarma, G.R., Chandra, I. y Ramachandran, G. (1990) *Tubercle* **71**, 277-282

97. Rook, G.A.W., Honour, J., Kon, O.M., Wilkinson, R.J., Davidson, R. y Shawn, R.J. (1996) *Q.J. Med.* **88**, 333-41
98. Rook, G.A.W., Baker, R. y Walker, B. (2000) *Ann. NY. Acad. Sci.* **917**, 913-922
99. Hernandez-Pando, R., Orozco, H., Honour, J., Silvia, P. y Rook, G.A.W. (1995) *FEMS Microbiology Immunology* **12**, 63-72
100. Onwubalili, J.K., Scott, G.M. y Smith, H. (1986) *Q.J. Med.* **59**, 599-561
101. Scott, G.M., Murphy, P.G. y Gemidjioglu, M.E. (1990) *J. Infect.* **21**, 61-69
102. Zuckerman, S.H., Shelhaas, J. y Butler, L.D. (1989) *Eur. J. Immunol.* **19**, 301-305
103. Bertini, R., Bianchi, M. y Ghezzi, P. (1988) *J. Exp. Med.* **167**, 1708-1712
104. Hernandez-Pando, R., Aguilar-Leon, D. y Orozco, H. (2005) *J. Infect. Dis.* **191**, 299-306
105. Rios-Barrera, V., Campos-Peña, V., Aguilar-Leon, D. y Hernandez-Pando, R. (2006) *Eur. J. Immunol.* **36**, 345-353
106. Hernandez-Pando, R., Schön, T., Orozco, E.H., Serafin, M. y Estrada, G.I. (2001) *Exp. Toxicologic Pathol.* **53**, 257-265
107. Pedroza-Gonzalez, A., Garcia-Romo, G.S. y Aguilar-Leon, D. (2004) *Int. J. Exp. Pathol.* **85**, 135-145
108. García-Romo, G.S., Pedroza-Gonzalez, A., Aguilar-Leon, D., Orozco, E.H., Lambrecht, B., Estrada, G.I., Flores-Romo, L. y Hernandez-Pando, R. (2004) *Immunology* **112**, 661-668
109. Banchereau, J. y Steinman, R. (1998) *Nature* **392**, 245-252
110. Gumperz, J.E. y Brenner, M.B. (2001) *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 471-478
111. Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J. y Koppel, E.A. (2003) *J. Exp. Med.* **197**, 7-17
112. Tailleux, L., Schwartz, O. y Herrmann, J.L. (2003) *J. Exp. Med.* **197**, 121-127
113. Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. (2001) *Eur. J. Immunol.* **31**, 3388-3393
114. Kadowaki, N., Ho, S. y Antonenko, S. (2001) *J. Exp. Med.* **194**, 863-869
115. Turley, S.J., Inaba, K. y Garrett, W.S. (2000) *Science* **288**, 522-527
116. Steinman, R.M. (2001) *Mt. Sinai J. Med.* **68**, 160-166
117. Stenger, S., Niazi, K.R. y Modlin, R.L. (1998) *J. Immunol.* **161**, 3582-3588
118. Stock, P., Akbari, O., Berry, G., Freeman, G.J., Dekruyff, R.H. y Umetsu, D.T. (2004) *Nat. Immunol.* **5**, 1149-1156
119. Barrat, F.J., Cua, D.J., Boonstra, A., Richards, D.F., Crain, C., Savelkoul, H.F., de Waal-Malefyt, R., Coffman, R.L., Hawrylowicz, C.M. y O'Garra, A. (2002) *J. Exp. Med.* **195**, 603-616
120. Ribeiro-Rodriguez, R., Resende, T., Rojas, R., Toosi, Z., Dietze, R., Boom, W.H., Maciel, E. y Hirsch, C.S. (2006) *Clin. Exp. Immunol.* **144**, 25-34
121. Roberts, T., Beyers, N., Aguirre, A. y Walzl, G. (2007) *J. Infect. Dis.* **195**, 870-880
122. Hernández-Pando, R., Aguilar, D., Orozco, H., Cortez, Y., Brunet, L.R., y Rook, G.A. (2008) *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1730-6
123. Baumann, H. y Gauldie, J. (1994) *Immunol. Today* **15**, 74-80
124. Baumann, H. y Gauldie, J. (1990) *Mol. Biol. Med.* **7**, 147-159
125. Hernandez-Pando, R., Arriaga, K., Panduro, C.A., Orozco, E.H., Larriva-Sahd, J. y Madrid-Marina, V. (1998) *Exp. Mol. Pathol.* **65**, 25-36
126. Martinez-Cordero, E., González, M.M., Aguilar-Leon, D., Orozco, E.H. y Hernandez-Pando, R. (2008) *Tuberculosis (Edinburgh)* **88**, 203-211
127. Rivas-Santiago, C., Rivas-Santiago, B., Aguilar-León, D., Castañeda-Delgado, J. y Hernández-Pando, R. (2001) *Clinic. Exp. Immunol.* En prensa.
128. Rook, G.A.W., Lowry, D. y Hernandez-Pando, R. (2007) *J. Infect. Dis.* **196**, 191-198

Semblanza del Dr. Rogelio Hernández Pando



El Dr. Rogelio Hernández Pando es Médico Cirujano Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (1979). Especialista en Anatomía Patológica, Departamento de Patología Hospital General de México, Fac de Medicina UNAM (1984). Realizó una maestría en Investigación Biomédica Básica (Inmunología), en el Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM (1988). El Doctorado en Investigación Biomedica Basica (Inmunología), en el Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM (1993) y el Posdoctorado en Inmunopatología en el Department of Microbiology. School of Pathology.

University College of London, England (1993-1994). Actualmente es Investigador en Ciencias Médicas "F", y Jefe de la Sección de Patología Experimental del Departamento de Patología Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Sus líneas de investigación incluyen la Patología e Inmunopatología Experimental. Inmunopatología de la tuberculosis. Pertenece al SNI- nivel 3. Ha dirigido un gran número de tesis. Ha publicado 175 trabajos Internacionales y escrito 18 libros, además de tener 3 patentes.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 17-26. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

ESTRUCTURAS VIRALES EN NANOMEDICINA

VIRAL STRUCTURES IN NANOMEDICINE

Lorena P. Sánchez-Sánchez, Rafael Vazquez-Duhalt
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62250 México
vazqduh@ibt.unam.mx

Resumen

La nanotecnología ha realizado grandes avances en la creación de nuevas superficies, nuevos materiales y nuevas formas que encuentran aplicaciones en el campo de la biomedicina. La nanomedicina, especialmente el uso de las partículas virales, se ha visto beneficiada por el desarrollo de la nanotecnología en áreas como el suministro controlado de medicamentos, imagen y agentes de contraste, y biosensores. Las cápsides virales son usadas como contenedores proteicos, andamiajes y templados para la producción de materiales bio-nanoestructurados, donde moléculas orgánicas e inorgánicas pueden ser incorporadas de manera precisa y controlada. Los usos potenciales de las partículas virales incluyen: i) Terapia génica, en donde las partículas virales son usadas para transportar y suministrar el gene terapéutico en las células blanco. ii) Suministro de controlado de medicamentos para asegurar que los fármacos ingresen al cuerpo y alcancen el tejido en donde se requiere del efecto terapéutico. iii) Imagen, en donde se podrá, de manera efectiva, visualizar tejidos blandos. Las partículas virales son acopladas a agentes de contraste y usadas en análisis de ultrasonido, de resonancia magnética y aún de rayos X convencionales para visualizar exitosamente dentro de los órganos blanco. iv) Finalmente, biosensores para la detección de diversos metabolitos o para la medición de algunas condiciones fisicoquímicas del tejido blanco. En éste trabajo discute las aplicaciones potenciales en biomedicina de las partículas pseudovirales.

Palabras clave: Bionanotecnología, cápsides virales, nanotecnología, nanomedicina, partículas virales.

Abstract

Nanotechnology has made great steps forward in the creation of new surfaces, new materials and new forms which find application in the biomedical field. Nanomedicine, specially the use of viral particles, started benefiting from the use of nanotechnology in areas such as controlled release systems, imaging and biosensors. Viruses are used as protein cages, scaffolds, and templates for the production of bio-nanostructured materials, where organic and inorganic molecules could be incorporated in a precise and a controlled way. Potential application of virus particles include: i) Gene therapy, in which the virus particle is used as a carrier to deliver the therapeutic gene to target cells. ii) Drug delivery to ensure that pharmaceuticals get into the body and reach the tissue where they are needed to achieve a therapeutic effect. iii) Imaging, that allows to effectively and successfully inspect and image soft tissues. Viral particles are coupled with an imaging agent and then using ultrasound, magnetic resonance or even traditional X-ray, it is possible to visualize the inside of the targeted organ. iv) Finally, biosensors for the detection of diverse analytes or to measure some physicochemical conditions of the target tissue. In this work, these potential biomedical applications of virus-like particles are discussed.

Keywords: Bionanotechnology, nanotechnology, nanomedicine, virus-like particles, virus capsids.

Introducción

La nanotecnología es un área de la ciencia que involucra el estudio y la manipulación de la materia a escala nanométrica, de 1 a 100 nm en por lo menos alguna de sus dimensiones, para en última instancia generar una aplicación práctica. Dentro de esta escala la materia presenta propiedades fisicoquímicas particulares, a nivel eléctrico, óptico y mecánico por mencionar algunas, que se derivan del incremento dramático en la relación de área superficial a volumen; así como al confinamiento de los electrones en un espacio reducido [1].

La bionanotecnología, una división de la nanotecnología, se enfoca en la investigación y en el desarrollo de nuevos materiales a escala nanométrica basados en biomoléculas, tales como ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos, para fines específicos. Dentro de estos materiales naturales se encuentran las partículas pseudovirales o VLPs (virus-like particles) que recientemente han recibido gran atención debido al alto potencial que presentan dentro de este campo, en particular en el área de la ciencia de materiales y la nanomedicina [2]. Si bien es cierto que las partículas virales han sido usadas intensivamente en la producción de vacunas [3], nuevas aplicaciones biomédicas se ven en el horizonte tecnológico y de esas son las que nos ocuparemos en este trabajo.

Las VLPs, a diferencia de los virus, no contienen el material genético natural de éstos, por lo que no son partículas infecciosas al no poder auto propagarse. Estas partículas de origen viral pueden ser utilizadas como andamiajes básicos para el diseño y fabricación de materiales nanoestructurados (Figura 1). Dentro de las características importantes de estas nanopartículas se encuentran las siguientes [4, 5]:

- i) Presentan arquitecturas altamente ordenadas de dimensiones nanométricas que tienen la capacidad de autoensamblaje.
- ii) Cuentan con estructuras monodispersas en tamaño y composición.
- iii) Existen en una variedad de formas distintas (icosaedros, tubos, hélices) con estabilidades diferentes (a pH, fuerza iónica, temperatura, etc.).
- iv) Cuentan con grandes áreas superficiales con una gran cantidad y variedad de sitios reactivos que permiten el acoplamiento de múltiples ligandos (polivalencia).
- v) Presentan cavidades huecas que pueden ser utilizadas para encapsular moléculas con diversos fines.
- vi) Tienen la capacidad de internalización dentro de las células, y son biocompatibles y biodegradables.

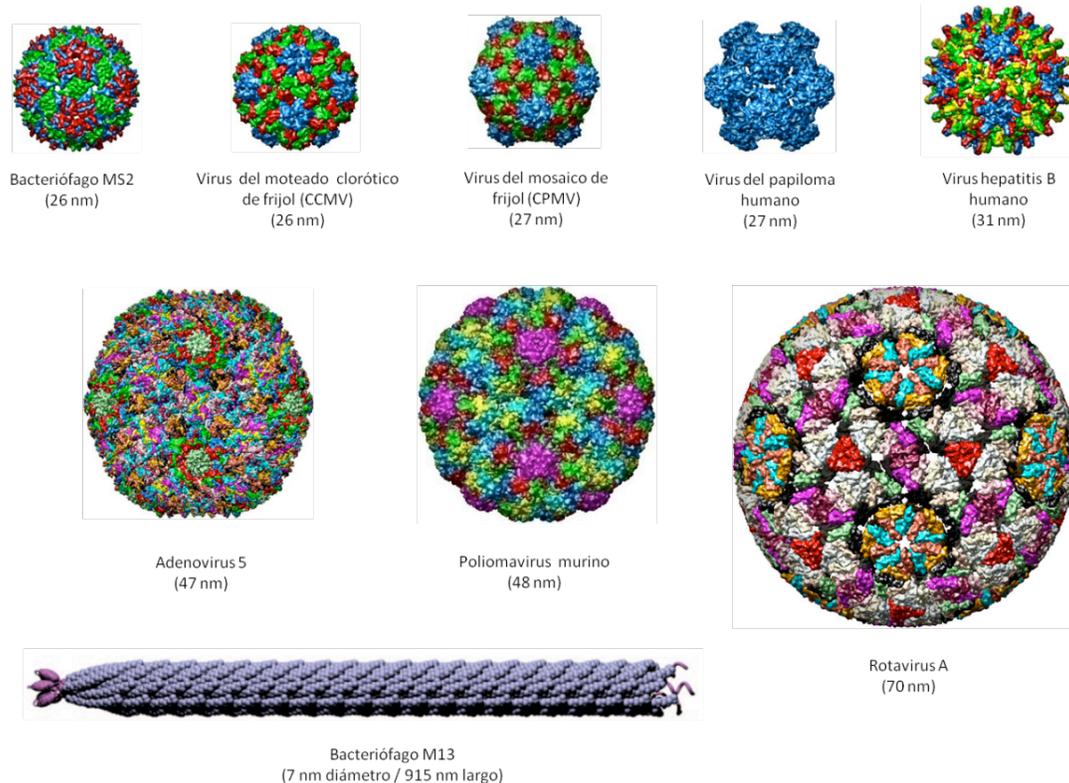


Figura 1. Estructura de diversos virus que han sido utilizados en bionanotecnología con aplicaciones médicas. Las imágenes de las cápsidas icosaédricas fueron obtenidas de VIPERdb. El Bacteriófago M13 fue reproducido de [6].

Las nanopartículas virales cuentan con tres interfaces disponibles para ser manipuladas ya sea químicamente o genéticamente: la cara externa, la cara interna y la interface entre las subunidades proteicas (Figura 2). Las distintas superficies pueden ser explotadas para modular con precisión la incorporación de nuevas funciones a estas nanopartículas para diversas aplicaciones [7].

Aplicaciones de las partículas virales en nanomedicina

Terapia génica

Las VLPs han sido ampliamente estudiadas para su uso potencial en la terapia génica, explotando la capacidad natural de estas partículas para transportar ácidos nucleicos e integrar estos genes al genoma del “hospedero”. Generalmente las nanopartículas utilizadas provienen de virus de mamífero debido a la capacidad intrínseca de éstos para poder internalizarse dentro de células humanas así como de otros animales modelo [8].

Las nanopartículas virales más utilizadas para la terapia génica se derivan de la familia de los adenovirus, estos son virus de cadena doble de DNA que presentan cápsides icosaédricas. Hasta la fecha el 24% de los ensayos clínicos en terapia génica involucran este tipo de virus (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>). Estos vectores virales, de tercera generación, tienen una capacidad de carga de hasta 35 kilobases de DNA no viral, lo que permite la incorporación de transgenes grandes así como de elementos de regulación [9].

Entre las ventajas que poseen estos vectores son la relativa facilidad en la producción de altos títulos virales, la habilidad de transducir con alta eficiencia tanto células en división como células quiescentes, gran estabilidad en el genoma, bajos niveles de integración del genoma viral, y buena caracterización biológica del virus [10].

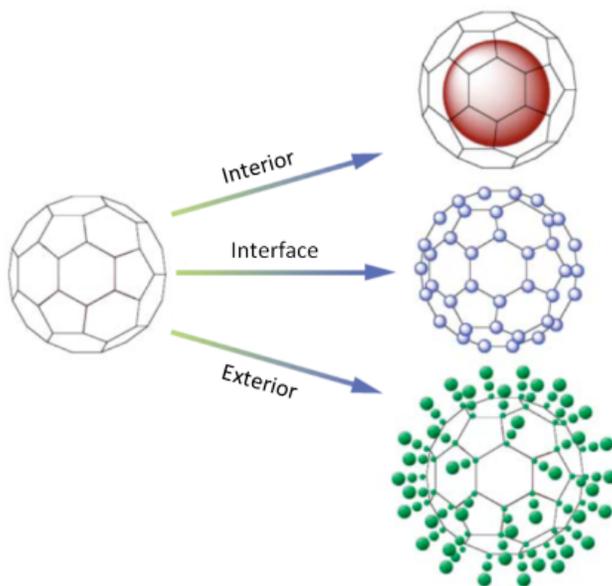


Figura 2. Representación esquemática de las tres interfaces en las partículas pseudovirales que pueden ser modificadas para la incorporación de nuevas funciones (Imagen modificada de [7]).

Estas VLPs pueden ser modificadas químicamente en la superficie con polímeros como el polietilenglicol (PEG) y poli-N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (poli-HPMA), con la finalidad de disminuir la inmunogenicidad de la partícula evitando así la rápida eliminación de ésta del organismo, así como para re-direccionar la nanopartícula cambiando la especificidad hacia el receptor que será utilizado para internalizarse dentro de las células blanco [11].

Suministro controlado de fármacos

Además de poder transportar genes a células blanco para ser utilizados en terapia génica, se ha investigado la posibilidad de administrar otras moléculas como agentes terapéuticos por medio de VLPs. La finalidad de utilizar nanopartículas virales es la de dirigir y localizar estas moléculas con potencial biomédico al sitio de acción, con el fin de reducir los efectos secundarios potenciales e incrementar la eficiencia terapéutica. De esta manera se previenen uniones no específicas de estos fármacos, se evita la degradación de los mismos y se aumenta su biocompatibilidad [12].

Existen una variedad de trabajos en donde se ha logrado ya sea encapsular o desplegar fármacos en la superficie de las VLPs, principalmente de origen quimioterapéutico [13-15]. Un trabajo interesante es el presentado por Bar et al. [16] en el que un fago filamentoso fue modificado ya sea químicamente con el fármaco quimioterapéutico higromicina o genéticamente con doxorubicina, un medicamento también utilizado para combatir el cáncer. La estrategia utilizada para funcionalizar el fago con la doxorubicina fue mutar por ingeniería genética el extremo N-terminal de la proteína mayoritaria de la cápside, p8, introduciendo un péptido sensible a la degradación por la catepsina B, el cual fue conjugado con el fármaco en cuestión. Con el fin de dirigir las VLPs a los sitios de interés se unieron tres anticuerpos IgG distintos a proteínas del fago, que reconocen receptores específicos en células cancerígenas. De esta manera las VLPs funcionalizadas con los agentes quimioterapéuticos fueron dirigidas e internalizadas a células tumorales *in vitro*, llevándose a cabo la liberación controlada de la doxorubicina al ser proteolizado el péptido por la catepsina B presente en los lisosomas y dando como resultado final la muerte celular. La multivalencia de este fago filamentoso permitió la unión de alrededor de 3500 moléculas de fármaco por nanopartícula, lo que incrementó de manera significativa la eficiencia en la inhibición del crecimiento tumoral.

Otras moléculas con potencial biomédico son los fotosensibilizadores utilizados en la terapia fotodinámica dirigida (targeted photodynamic therapy, PDT). Estas moléculas al ser excitadas a longitudes de onda específicas, generan especies reactivas de oxígeno que son capaces de matar las células deseadas [17].

Partículas derivadas del virus del moteado clorótico del frijol (CCMV) fueron doblemente funcionalizadas para matar bacterias por medio de PDT [18]. Las nanopartículas fueron covalentemente modificadas con complejos de rutenio como fotosensibilizador (Fig. 3), y después dirigidas por medio de anticuerpos contra bacterias patógenas de *Staphylococcus aureus* formadoras de biopelículas. Las VLPs funcionalizadas y expuestas a una longitud de onda específica (470 nm) liberaron especies reactivas de oxígeno.

Las enzimas también pueden ser utilizadas como agentes terapéuticos, sin embargo, su potencial hasta la fecha ha sido poco explotado ya que presentan ciertas limitaciones dentro de las que se encuentran, la susceptibilidad a degradación por proteasas y la inhabilidad de éstas para ser dirigidas y entrar a las células deseadas. Estas desventajas pueden ser superadas al encapsular estos biocatalizadores dentro de VLPs.

La enzima citosina desaminasa de levadura fue encapsulada dentro de VLPs derivadas del virus de simio 40 (SV40) perteneciente a la familia del poliomavirus. Esta enzima es capaz de transformar el profármaco 5-fluorocitosina en el medicamento activo 5-fluorouranilo que induce la muerte celular. Se encontró que cuando células de simio CV-1 fueron retadas con las VLPs con citosina desaminasa en su interior, se volvían sensibles a la presencia de 5-fluorocitosina debido a la transformación en 5-fluorouranilo. Este es un ejemplo del potencial de las partículas virales como acarreadoras de una actividad enzimática hacia un tejido blanco específico [19].

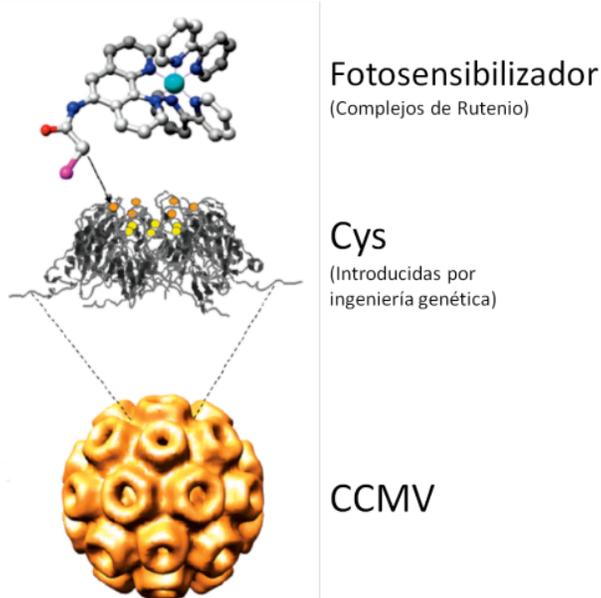


Figura 3. Se muestran las cisteínas introducidas por mutagénesis en la superficie de la VLP derivada de CCMV, por la cuales se llevó a cabo la conjugación química del fotosensibilizador (Modificada de [18]).

Visualización *in vivo*

Los compuestos para la visualización *in vivo* (*in vivo* imaging) son hoy en día ampliamente utilizados en la medicina para el diagnóstico y evaluación de tratamientos terapéuticos. Las partículas pseudovirales están siendo utilizadas dentro de este campo ya que pueden ser funcionalizadas, en el exterior o el interior, con múltiples copias de moléculas de contraste como fluoróforos (incluyendo proteínas fluorescentes), puntos cuánticos (quantum dots), así como ciertos metales. Aunado a lo anterior, tienen la capacidad de ser dirigidas y acumularse en sitios blanco específicos. Ambas características incrementan la especificidad, sensibilidad y biocompatibilidad de las técnicas de visualización *in vivo* [20].

En el caso de la inmovilización de fluoróforos en nanopartículas virales existe una ventaja importante, ya que a pesar de conjugarse una gran cantidad de estas moléculas, se puede hacer de manera diseñada en posiciones específicas, evitando la interacción y agregación de estos fluoróforos, disminuyendo en consecuencia el apagamiento o “quenching” de agentes fluorescentes [21].

Un ejemplo interesante del uso de estas nanopartículas en biovisualización es el reportado por Hooker, 2007 [22], en donde VLPs derivadas del fago MS2 fueron conjugadas químicamente con iones Gd^{3+} , un agente de contraste utilizado en la técnica de imagen por resonancia magnética, la cual es una herramienta no invasiva cada vez más utilizada en el diagnóstico de múltiples enfermedades. En este trabajo se llevó a cabo la funcionalización de la partícula viral con el metal, ya sea por la cara exterior o por la cara interior, encontrando que las nanopartículas modificadas por la cara interna presentaban además de una mayor solubilidad y estabilidad, un aumento importante en la relajación de fluorescencia, lo que permitió aumentar la sensibilidad de la técnica.

Se han generado inclusive VLPs funcionalizadas con proteínas fluorescentes para elucidar los mecanismos de infección y patogénesis de ciertos virus. Se encontró que la proteína de cápside VP2 del parvovirus B19 humano conjugado en la superficie externa con la proteína

verde fluorescente mejorada (EGFP) fue capaz de internalizarse en células cancerígenas y por medio de la red de microtúbulos llegar hasta el núcleo (Fig. 4) [23]. Estas nanopartículas fluorescentes además de ser útiles para entender la biología de infección de los virus, pueden ser rastreadas para comprender el comportamiento de las VLPs *in vivo*.

Diagnóstico *in vitro*

Otra aplicación interesante en donde las VLPs están ganando terreno es en la de biosensores para la detección de, por ejemplo, DNA, toxinas de organismos patógenos, o proteínas de marcaje de enfermedades (protein disease markers). En este caso las nanopartículas virales sirven como andamiajes en donde pueden ser adheridas una variedad de moléculas de reconocimiento así como una gran cantidad de moléculas reporteras, con el fin de generar sensores con una alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico *in vitro* [24]. Estas VLPs se han utilizado principalmente para dos técnicas distintas, microarreglos e inmunoensayos.

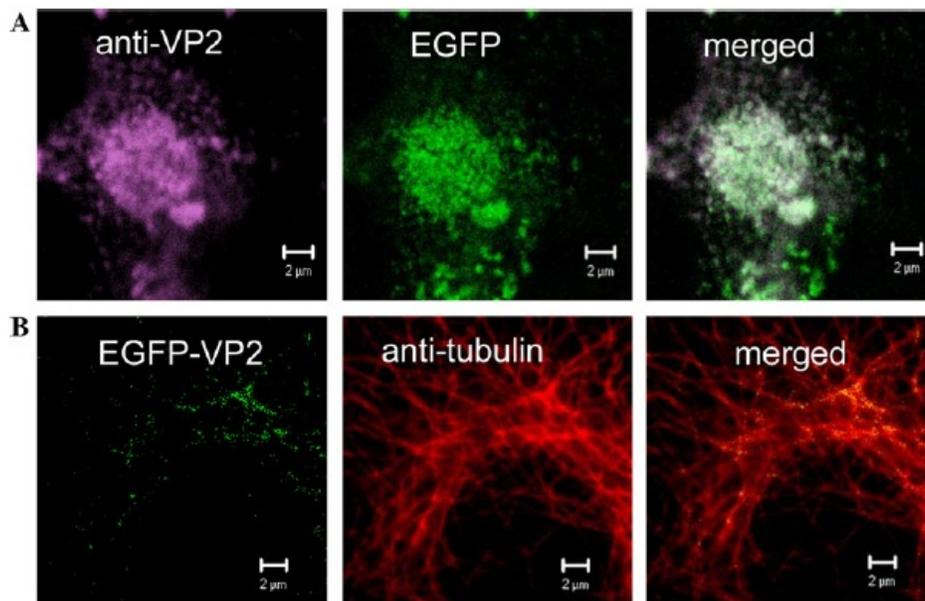


Figura 4. Imagen confocal de células Hep G2 incubadas con la VLP EGFP-VP2. A) Inmunotinción con anti-VP2 visualizado con Alexa-633 anti-ratón a las 6 h de incubación, la EGFP fue visualizada directamente. Se observa la colocalización de VP2 con EGFP corroborando la integridad de la nanopartícula. B) Inmunotinción con anti- α tubulina visualizado con Alexa-546 anti-ratón a las 4 h de incubación. Se observa en amarillo la colocalización de la VLP EGFP-VP2 con los microtúbulos (Imagen modificada de [23]).

Con el propósito de aumentar la sensibilidad en microarreglos de baja densidad, en donde la concentración de DNA es pequeña, las VLPs derivadas del virus del mosaico del frijol (CPMV) fueron funcionalizadas con 42 fluoróforos de carbocianina (Cy5) y una molécula que reconoce biotina, llamada NeutrAvidina (NA) por VLP, por medio de la conjugación con cisteínas en la superficie introducidas por ingeniería genética. La nanopartícula NA-Cy5-CPMV fue utilizada para detectar genes de la bacteria patógena *Vibrio cholerae* O139 por medio de un microarreglo. Se encontró que la nanopartícula se une específicamente a DNA biotinilado, gracias al reconocimiento por la NA (Fig. 5). Debido a la gran cantidad de fluorescencia emitida

por las moléculas de Cy5 se pudo detectar un porcentaje importante de genes a bajas concentraciones de DNA templado, en el orden de 1 a 10 copias del genoma [25].

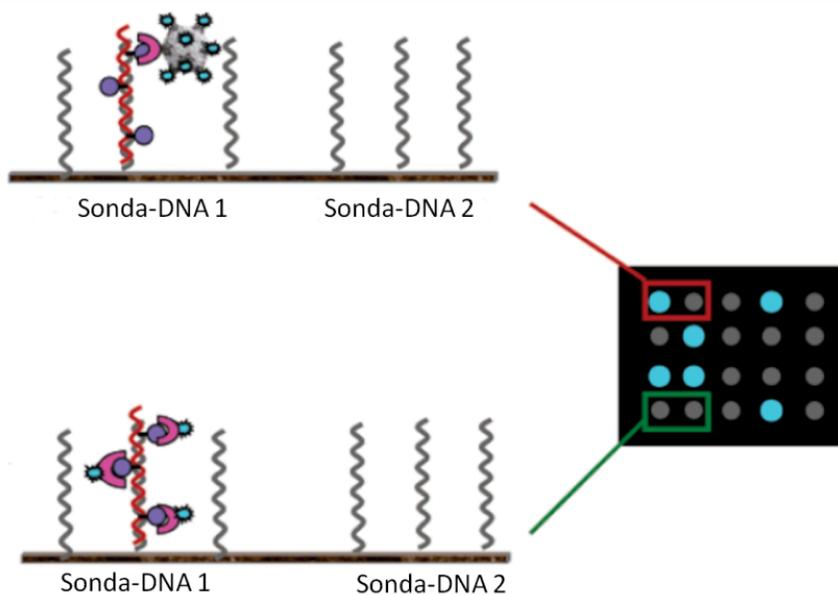


Figura 5. Esquema comparativo utilizando el método de detección por NA-Cy5-CPMV con el ahora utilizado estreptavidina-Cy5 (Imagen modificada de [25]).

Para incrementar la eficiencia de los inmunoensayos para el diagnóstico de ciertas enfermedades es necesario contar con un sistema altamente sensible. Para ello la cápside del virus de hepatitis B ha sido modificada genéticamente para expresar un fragmento de la proteína A de estafilococo (SPA_B) en su superficie. Este fragmento cuenta con una afinidad específica contra el dominio Fc de las inmunoglobulinas G (IgG). De esta forma se logró orientar a los anticuerpos con los dominios variables antígeno específicos totalmente accesibles para reconocer proteínas de marcaje, tales como la troponina, proteína que se encuentra presente en el suero de pacientes con daño en el músculo cardíaco y que presentan una alta propensión a ataques cardíacos. La utilización de estas VLPs junto con placas funcionalizadas, ya sea con membranas de PVDF o nanoestructuras de níquel, se logró aumentar la sensibilidad de la técnica a nivel attomolar (10^{-18} M), de seis a siete órdenes de magnitud mayor que lo logrado con las ensayos de ELISA actualmente utilizados [26].

Desafíos para la aplicación de partículas virales

A pesar de las distintas ventajas que ofrecen las partículas pseudovirales dentro del área biomédica se deben superar ciertos inconvenientes para ser utilizadas de manera práctica, los cuales están principalmente relacionados con la interacción de estas nanopartículas con el sistema inmune. Diversas estrategias han sido propuestas para evadir el reconocimiento por el sistema inmune que incluyen el recubrimiento con polímeros o la ingeniería de proteínas mutando los epítopes más inmunogénicos [13]. La toxicidad de estas nanopartículas también deberá ser evaluada poniendo énfasis en comprender el destino de estas partículas así como efectos secundarios potenciales que pudieran tener en el organismo [27].

Otro problema que deberá solucionarse para expandir el uso de las VLPs es la obtención de éstas en grandes cantidades ya que, aunque algunas cápsides virales pueden ser obtenidas

en grandes cantidades, otras son difíciles de expresar y purificar por lo que se deberá hacer un esfuerzo importante para generar sistemas de expresión heteróloga eficientes [28].

Finalmente se ha probado que las VLPs son excelentes sistemas *in vitro* para diversas aplicaciones en el área biomédica, que incluyen el suministro controlado de genes y fármacos, visualización y biosensores. Estas nanopartículas de origen viral resultan candidatas prometedoras para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades en el futuro próximo.

Referencias

1. Service, R. (2004) *Science* **304**, 1732-1734
2. Manchester, M. y Steinmetz, N. (2009) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **327**, v-vi
3. Roldao, A., Mellado, M., Castilho L. y Alves, P. (2010) *Expet. Rev. Vaccine* **9**, 1149-1176
4. Lee, A., Niu Z. y Wang, Q. (2009) *Nano Res.* **2**, 349-364
5. Strable, E. y Finn, M. (2009) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **327**, 1-18
6. Khalil, A., Ferrer, J., Brau, R., *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 4892-4897
7. Douglas, T. y Young, M. (2006) *Science* **312**, 873-875
8. Verma, I. y Weitzman, M. (2005) *Ann. Rev. Biochem.* **74**, 711-738
9. Campos, S. y Barry, M. (2007) *Curr. Gene Ther.* **7**, 189-204
10. Volpers, C. y Kochanek, S. (2004) *J. Gene Med.* **6**, S164-S171
11. Kreppel, F. y Kochanek, S. (2008) *Mol. Ther.* **16**, 16-29
12. Lee, A. y Wang, Q. (2006) *Nanomedicine NBM* **2**, 137-149
13. Abbing, A., Blaschke, U., Grein, S., *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 27410-27421
14. Zhao, Q., Chen, W., Chen, Y., Zhang L. y Zhang, Z. (2011) *Bioconj. Chem.* **16**, 346-352
15. Ren, Y., Wong S. y Lim, L. (2007) *Bioconj. Chem.* **18**, 836-843
16. Bar, H., Yacoby I. y Benhar, I. (2008) *BMC Biotechnol.* **8**, 37
17. Steinmetz, N. (2010) *Nanomedicine NBM* **6**, 634-641
18. Suci, P., Gillitzer, V. Z, E., Douglas, T. y Young, M. (2007) *Langmuir* **23**, 12280-12286
19. Inoue, T., Kawano, M., Takahashi, R., *et al.* (2008) *J. Biotechnol.* **134**, 181-192
20. Mateu, M. (2011) *Protein Eng. Des. Sel.* **24**, 53-63
21. Li, K., Nguyen, H., Lu X. y Wang, Q. (2010) *Analyst* **135**, 21-27
22. Hooker, J., Datta, A., Botta, M., Raymond K., y Francis, M. (2007) *Nano Lett.* **7**, 2207-2210
23. Gilbert, L., Toivola, J., White, D., *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 527-535
24. Soto, C. y Ratna, B. (2010). *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 426-438
25. Soto, C., Szuchmacher, A. Vora, G., *et al.* (2006) *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 5184-5189
26. Park, J., Cho, M., Lee, E., *et al.* (2009) *Nature Nanotechnol.* **4**, 259-264
27. Sánchez-Rodríguez, S., Münch-Anguiano L. y Bustos-Jaimes, I. (2010) *Curr. Chem. Biol.* **4**, 231-243
28. Pattenden, L., Middelberg, A., Niebert M. y Lipin, D. (2005). *Trends Biotechnol.* **23**, 523-529

Semblanza del Dr. Rafael Vázquez Duhalt



El Dr. Vázquez Duhalt nació el 5 de Enero de 1956, en la ciudad de México, D.F. Realizó estudios de Ingeniería Química Industrial en el Instituto Politécnico Nacional, estudios a nivel maestría en Química Analítica del Ambiente en la Universidad de Ginebra en Suiza y en Ecología Humana en el Centro Europeo de Ecología Humana, avalado por 7 Universidades Europeas. Además obtuvo el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas en la Universidad de Ginebra en Suiza. Actualmente es Investigador Titular y líder académico en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca.

El Dr. Vázquez Duhalt ha sido consultor para el Environment Canadá (1993), Desert Energy Research Inc., U.S.A. (1994-1995), KAM Biotechnology Ltd., Canadá (1995), Instituto Colombiano del Petróleo. ECOPETROL (1995-1998), Petróleos Mexicanos, PEMEX-Refinación (1997), la empresa Dinámica Agrícola y Ambiental S.A. de C.V. (2001-2004), Boehringer Ingelheim Vetmédica S.A. de C.V (2005), la empresa Flores y Ríos S.A de C.V. (2005-2009) y British Petroleum Ltd. (2008-2010) Se le ha otorgado una patente en Estados Unidos para un proceso enzimático de desulfuración de combustibles petroleros y tiene dos patentes nacionales de carácter ambiental. Ha publicado un libro de texto "Termodinámica Biológica" editado por AGT Editor y es compilador y autor de "Petroleum Biotechnology, developments and perspectives" publicado por Elsevier B.V.

Desde el punto de vista académico, el Dr. Vázquez Duhalt ha publicado 103 artículos de investigación en revistas indizadas de prestigio internacional, 2 libros, 8 capítulos de libros, 14 memorias in extenso y 8 artículos de difusión científica. El impacto de sus trabajos está soportado por más de 1625 citas a sus trabajos y un índice H de 23. El Dr. Vázquez Duhalt es Investigador Nacional nivel III y ha sido invitado a dictar decenas de conferencias en México y en el extranjero.

El Dr. Vázquez Duhalt ha sido reconocido en el 2009 por la empresa de información científica Thomson Reuters por el artículo mexicano más citado en la década 1999-2009 en microbiología. En ese mismo año el Gobierno del Estado de Morelos le otorgó el Premio al Mérito Estatal de Investigación. En el 2007 se le otorgó el Premio "Luis Elizondo" por el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey. En 2006 le fue concedida una Mención Honorífica al Mérito Ecológico por la SEMARNAT. En el 2005 el Consejo de Egresados ESIQIE del Instituto Politécnico Nacional le otorgó el Premio "Hilario Ariza Dávila" en Investigación. Además obtuvo el Premio Alfredo Sánchez Marroquín que otorga la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería por la Dirección de Tesis a la Mejor tesis de doctorado de Marcela Ayala Aceves en el año del 2003.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 27-38. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

DUPLICACIÓN GÉNICA: IMPLICACIONES BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS Y EVOLUTIVAS EN *Saccharomyces cerevisiae*

GENE DUPLICATION: BIOCHEMICAL, PHYSIOLOGICAL AND EVOLUTIVE IMPLICATIONS IN *Saccharomyces cerevisiae*

Geovani López, Mirelle Flores, Mariana Duhne, Joao Sánchez y Alicia González
Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Instituto de Fisiología Celular, UNAM,
Ciudad Universitaria, CP 04510, México DF
amanjarr@ifc.unam.mx

Resumen

*La duplicación génica constituye una de las principales fuentes de variación y por tanto, juega un papel crucial en la generación de diversidad biológica. Se ha determinado que tras los procesos de duplicación y fijación de genes, ocurre una diversificación funcional que tiene su origen en los cambios diferenciales en la expresión de cada una de las copias y en cambios de la región codificante, que influyen en las propiedades cinéticas y estructurales de las proteínas parálogas, esto ha llevado a proponer que la duplicación génica es y ha sido la principal fuente de innovación y diversificación bioquímica de genes y funciones asociadas a sus productos. Después de la secuenciación de *S. cerevisiae* se concluyó que el 28.6% de sus genes se encontraban duplicados, también se determinó, que estos parálogos procedían de eventos independientes de duplicación a nivel de genes, así como de una duplicación total del genoma, la cual contribuyó a la adquisición del metabolismo facultativo característico de esta levadura. Por lo tanto, *S. cerevisiae* constituye un excelente modelo de estudio para entender las implicaciones bioquímicas, fisiológicas y evolutivas de la duplicación génica.*

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, duplicación génica, versatilidad funcional, metabolismo facultativo.

Abstract

*Gene duplication constitutes one of the main sources of variation, it plays a crucial role in the generation of biological diversity. It has been determined that after the processes of gene duplication and fixation, functional diversification occurs due to changes in the coding regions and expression patterns which affect the kinetic and structural characteristics of paralogous proteins. This has led to the theory that gene duplication is the principal source of innovation and biochemical diversification of genes and functions associated to their products. The genome of *S. cerevisiae* revealed that 28.6% of its genes are duplicates. These paralogues were generated by both independent duplication events as well as a whole genome duplication, which contributed to the acquisition of facultative metabolism characteristic of this yeast. Therefore, *S. cerevisiae* constitutes an excellent model to understand the biochemical, physiological and evolutionary implications of gene duplication and diversification.*

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, gene duplication, functional versatility, facultative metabolism.

Introducción

Charles Darwin en “*Sobre el origen de las especies*” propuso que la variabilidad era la materia prima de la evolución, sin embargo, no desestimó que la modificación de ciertos órganos a través del tiempo tuviera su génesis sobre elementos primordiales muchas veces repetidos, los cuales cambiarían continuamente hasta constituir nuevos órganos y sistemas [1]. Esta primera aproximación sobre la multiplicidad de estructuras divergiendo a través del tiempo, sirvió de precedente en la concepción de la duplicación génica. En 1918, Calvin postula que pueden existir diversos elementos redundantes en los cromosomas, los cuales a su vez, podrían mutar y realizar funciones distintas de las que alguna vez llevaron a cabo. Los experimentos de Müller [2] consistieron en insertar parte del cromosoma X en el cromosoma 2 de *Drosophila melanogaster*, generándose una duplicación de algunos de los genes presentes en el cromosoma X, dado que las moscas en las que se llevó a cabo la inserción no perdieron viabilidad, Müller confirmó la propuesta de Calvin indicando que la duplicación génica podría generar a la postre, genes que en la actualidad serían difíciles de identificar como homólogos, aun cuando provinieran del mismo ancestro [3]. Estas observaciones iniciales, sirvieron de arquetipo en las concepciones posteriores que planteaban la pregunta sobre el origen y evolución de genes y genomas, constituyendo un argumento para explicar los cambios macroevolutivos en términos de pasos microevolutivos.

Los postulados y las diversas teorías que se gestaron alrededor de la duplicación génica fueron un precedente en las hipótesis que trataban de explicar el surgimiento y evolución de las vías metabólicas. Una de las primeras hipótesis fue desarrollada por Horowitz [4] y se denominó “stepwise” o “evolución retrógrada” y establece que la evolución de las primeras moléculas enzimáticas fue precedida por una serie de pasos en orden inverso a la generación de su producto final, de tal manera, que el último paso en la síntesis de biomoléculas fue el primero en ser adquirido en el curso de la evolución, mientras que el penúltimo fue el segundo y así sucesivamente [4]. El modelo de evolución retrógrada, supone que el reclutamiento fortuito de enzimas capaces de catalizar diversas reacciones fue un factor determinante en la sobrevivencia y adaptación de diferentes organismos.

Con el fin de explicar la evolución y el surgimiento de las vías metabólicas, en 1976 Jensen propuso la “*Hipótesis del mosaicismo*” (Patchwork) [5]. Según esta propuesta, células ancestrales que contenían un número pequeño de genes, y por ende un repertorio limitado de proteínas, poseían enzimas “primitivas” con una amplia especificidad en la captación de sustratos, es decir, la formación fortuita de metabolitos ofreció a esas células ancestrales una gran flexibilidad bioquímica con un mínimo contenido de genes, estas enzimas eran altamente inespecíficas y tenían una gran capacidad para catalizar reacciones químicas similares en diferentes vías metabólicas.

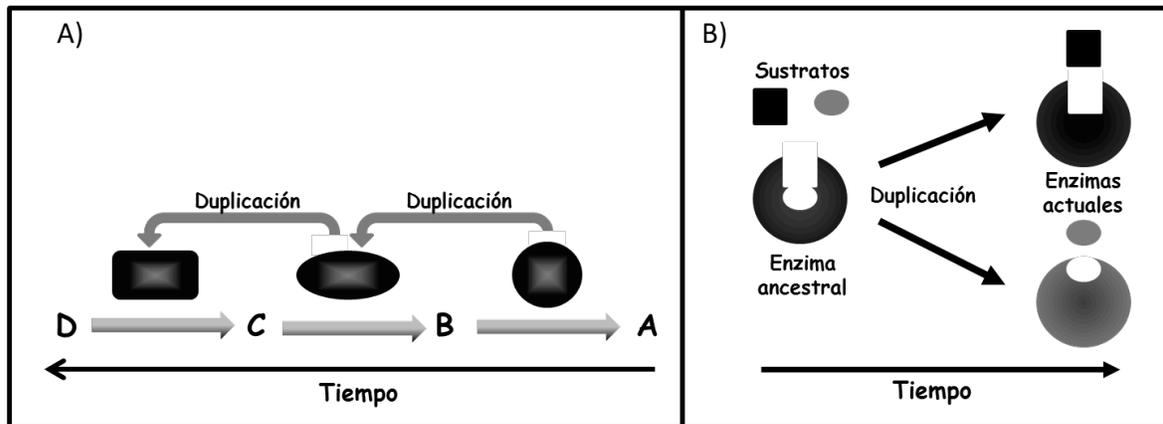


Figura 1. Esquemas que ilustran la importancia de la duplicación génica en el origen de las vías metabólicas. A) Modelo propuesto por Horowitz de evolución retrógrada, la enzima que cataliza el último paso dentro de una vía metabólica, es la primera en surgir y por medio de duplicación se generan nuevas enzimas que catalizarán reacciones subsecuentes dentro de la ruta. B) Modelo de Jensen; enzimas ancestrales que poseían ambigüedad por sustratos, mediante duplicación cada una de las nuevas enzimas se especializará para realizar funciones específicas.

Independientemente del modelo utilizado para explicar el origen del metabolismo primigenio, tanto Horowitz como Jensen, coinciden en que la duplicación génica tuvo un papel imprescindible en la posterior especialización y formación de nuevas enzimas con capacidades catalíticas y estructurales peculiares (Figura 1).

Duplicación de genes y evolución de nuevas funciones

La duplicación génica constituye una de las principales fuentes de variación genética y por tanto juega un papel crucial en la generación de diversidad biológica. A partir de la duplicación de un gen determinado se produce un estado de redundancia funcional que conlleva una disminución de la presión selectiva, lo que permite que ambas copias acumulen un mayor número de mutaciones, dando como resultado nuevas combinaciones a nivel regulatorio y de secuencia, lo cual conduce a la adquisición de productos génicos con propiedades catalíticas, estructurales y de reconocimiento distintas a las establecidas por un primer homólogo. A continuación se presenta el posible destino de los genes parálogos tras su duplicación:

Pseudogenización: una de las copias se pierde, ya sea porque acumuló mutaciones sobre su región regulatoria que impiden la expresión del gen, o bien, por mutaciones en la región codificante que imposibilitan la generación de un producto funcional. Los procesos de pseudogenización son los que ocurren con mayor frecuencia tras una duplicación génica.

Subfuncionalización: ambos genes resultan ser necesarios para llevar a cabo la función original debido a que han acumulado mutaciones, sobre su región codificante y/o regulatoria, o presentan un patrón de expresión diferencial que depende del contexto metabólico en el cual se encuentra el organismo en cuestión [6, 7, 8].

Neofuncionalización: mutaciones a lo largo de la región regulatoria y/o codificante, inciden directamente sobre patrones de expresión y de secuencia y propician la adquisición de nuevas funciones en los productos de genes parálogos (Figura 2). Los procesos de neofuncionalización incluyen el surgimiento de nuevos sitios de unión al DNA que puedan ser reconocidos por nuevos factores de transcripción, la modificación de residuos que alteren la especificidad, afinidad o cinética de las enzimas, así como la ganancia nuevos interactores por cambios en la secuencia codificante o por procesos de relocalización subcelular [9].

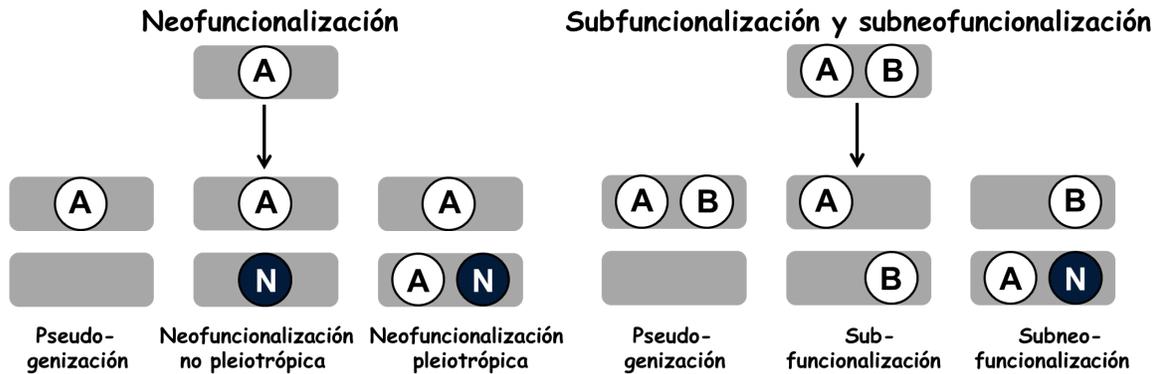


Figura 2. Representación esquemática los procesos subsecuentes a la duplicación génica (adaptado de Lieberles *et al.*, 2010).

Saccharomyces cerevisiae: vida con 6 mil genes

La existencia de genes duplicados es una característica presente en la mayoría de especies hasta ahora secuenciadas [10, 11]. Después de la secuenciación de *Saccharomyces cerevisiae* se concluyó que existía una gran cantidad de elementos repetidos sobre su genoma, el cual está compuesto por 12,068 kilobases; la cantidad de genes que potencialmente codifican para diversas proteínas asciende a casi 6000 [12]. Análisis posteriores llevaron a considerar que genes parálogos en *S. cerevisiae* habían sido resultado de una duplicación total de su genoma, así como de eventos independientes de duplicación. Wolfe y Shields [13] analizando regiones duplicadas sobre esta levadura encontraron que existe un 16% de genes duplicados a lo largo de su genoma y que provienen de una duplicación total ocurrida hace 100 millones de años. La importancia bioquímica, fisiológica y evolutiva de tal diploidía sugiere una posible adaptación de *S. cerevisiae* para sobrevivir en condiciones respiratorias y fermentativas. El evento de duplicación total del genoma coincidió con el surgimiento una gran variedad de plantas con fruto, de tal forma que existieron una gran cantidad de sustratos fermentables que estuvieron a disposición de comunidades microbianas, las cuales explotaron la capacidad para producir y consumir etanol, como ocurrió en la comunidad de *S. cerevisiae* [14, 15].

Hetero-oligomerización de monómeros codificados por genes parálogos en *S. cerevisiae*: implicaciones bioquímicas

Un aspecto notable relacionado con la organización de proteínas oligoméricas lo constituye el estudio de la transición de estructuras homoméricas (oligómeros de la misma proteína) a heteroméricas (oligómeros formados por proteínas parálogas) y el análisis de la importancia de esta transición en la aparición de nuevas funciones. Esta versatilidad funcional puede implicar una mayor estabilidad de los complejos, la adquisición de propiedades cinéticas diferentes o modificaciones en la redes de interacción con otras proteínas [16]. En este sentido, el estudio de la organización oligomérica de los productos de genes parálogos representa un modelo único, ya que en estos casos pueden coexistir formas homoméricas y heteroméricas. En principio, el heterómero no presentaría una ventaja sobre el homómero, a menos que el primero hubiese adquirido propiedades funcionales específicas en comparación al homómero. Un ejemplo que ilustra lo anterior son las proteínas parálogas Pfk1 y Pfk2 (fosfofructocinasas) de *S. cerevisiae*. Pfk1 y Pfk2 son enzimas claves en la glucólisis y su función está asociada a la formación de fructosa 1,6-bisfosfato a partir de fructosa 6 fosfato y ATP, ambas enzimas conforman un complejo hetero-octamérico compuesto por cuatro subunidades α y cuatro subunidades β , las cuales, a su vez son codificadas por *PFK1* y *PFK2*. Los monómeros correspondientes comparten un 55% de identidad a nivel de aminoácidos y aunque se ha propuesto que Pfk2 contiene los sitios de unión para el sustrato y determina la actividad catalítica del octámero, estudios previos muestran que la composición heteromérica entre los monómeros juega un papel crucial tanto para la estabilidad de la enzima como para que esta lleve a cabo su función enzimática [17,18]. Este escenario es sumamente interesante ya que representa un mecanismo de oligomerización entre productos de genes parálogos, donde sólo mediante la formación de complejos híbridos pueden estructurarse enzimas funcionales ya que como se mencionó anteriormente versiones homoméricas de las Pfk son inestables. Sin embargo, en bacterias y mamíferos las enzimas funcionales de las Pfk están compuestas por homotetrámeros y en algunos hongos que no presentan dos copias de PFK como en el caso de *Saccharomyces pombe* el producto oligomérico está constituido de homo-octámeros. Los trabajos centrados en la formación de complejos oligoméricos de estas enzimas, indican que la adquisición de mutaciones en cada uno de los miembros de un par de parálogos puede resultar en la división de funciones (subfuncionalización) a través de la organización alternativa en formas homo o hetero-oligoméricas.

La formación de heterómeros permite también la conformación de proteínas en las que la capacidad catalítica y regulatoria residen en monómeros diferentes. El caso de las enzimas parálogas Idh1 e Idh2 (isocitrato deshidrogenasa) ilustran este punto en particular ya que ambas subunidades constituyen un octámero funcional. Las subunidades codificadas por *IDH2* constituyen el dominio catalítico, en tanto que las codificadas por *IDH1* constituyen el dominio regulatorio [19].

Las enzimas Lys20/Lys21 (homocitrato sintasa) Gdh1/Gdh3 (glutamato deshidrogenasa) son productos de genes duplicados en *S. cerevisiae*, que provienen de la duplicación total del genoma y han sido ampliamente estudiadas por nuestro grupo de trabajo. Lys20 y Lys21 intervienen en el primer paso de la biosíntesis de lisina, tienen un 88% de identidad en nucleótidos y 92% en aminoácidos; catalizan la condensación de α -cetoglutarato y acetil coenzima A para formar homocitrato, ambos sustratos son intermediarios en el metabolismo central de carbono y tienen un papel importante en las vías de generación de energía durante el metabolismo aerobio, pero no durante el fermentativo. Las propiedades cinéticas de las isoenzimas son muy diferentes y presentan una inhibición alostérica diferencial por lisina con K_i 's de 1mM para Lys20 y 0.15mM para Lys21 [20]. Otra característica de Lys21 es que presenta cooperatividad para la unión de α -cetoglutarato en presencia de lisina, lo cual no ocurre con la proteína Lys20. Ambas isoenzimas constituidas posiblemente por dímeros, coexisten en condiciones fermentativas; sin embargo, Lys21 es la isoforma predominante. La regulación de

las cantidades relativas de isoformas permite el uso balanceado de sustratos debido a las diferentes propiedades cinéticas de las proteínas Lys20 y Lys21 [21].

Quezada *et al* (2008) proponen la posible formación de hetero-oligómeros entre Lys20 y Lys21. Esta propuesta se apoya en las siguientes observaciones: i) La proteína Lys20 se degrada más rápido en ausencia de Lys21. ii) La proteína Lys21 es insuficiente para producir niveles silvestres de lisina, por lo que se ha postulado que Lys21 protege de la degradación a Lys20 y este mismo heterocomplejo favorece una tasa de producción óptima de homocitrato y por ende de lisina, en condiciones fermento-respiratorias, donde los sustratos abundan más que durante el metabolismo respiratorio (Figura 3).

Por otra parte, dado que la retroinhibición por lisina no puede por si sola controlar la actividad de Lys20, evolucionó un mecanismo de inactivación que limita la actividad de esta isoforma en etanol, propiciando que el consumo de α -cetoglutarato y acetil coA no se dirija únicamente a la biosíntesis de lisina, sino que pueda ser canalizado, hacia vías de vital importancia en respiración como la de los ácidos tricarbónicos (Figura 5) [7, 21]. En estas condiciones, la biosíntesis de lisina depende mayoritariamente de la acción de Lys21.



Figura 3. La formación de diferentes dímeros Lys20 y Lys21 presentan distintas propiedades catalíticas y de estabilidad.

Las enzimas codificadas por los parálogos *GDH1* y *GDH3* (Gdh1 y Gdh3) juegan un papel muy importante en el metabolismo de *S. cerevisiae*, los genes poseen un 76% de identidad en nucleótidos y los productos un 86% en aminoácidos, son dependientes de NADP^+ , intervienen en la asimilación de amonio para producir glutamato, el cual, es un metabolito central en la biosíntesis no sólo de aminoácidos, sino también de purinas y pirimidinas. Ambas enzimas -como en el caso de las homocitrato sintasa- difieren en cuanto su cinética, su regulación alostérica y su afinidad por los sustratos [7]. Experimentos previos señalan que la expresión de *GDH1* es independiente de la fuente de carbono, mientras que la de *GDH3* se induce 70 veces en condiciones respiratorias, en presencia de etanol como única fuente de carbono [22].

Los resultados de DeLuna [7] mostraron que las enzimas codificadas por el par de genes duplicados *GDH1* y *GDH3* de *S. cerevisiae*, han subfuncionalizado de suerte que la síntesis de glutamato en condiciones fermentativas depende exclusivamente de la acción de Gdh1, en tanto que en condiciones respiratorias se requiere de la presencia y función de Gdh1 y Gdh3. Un resultado relevante de este trabajo, fue encontrar que se pueden formar heterómeros compuestos por diferentes subunidades de Gdh1p y Gdh3p, la formación de estos hexámeros híbridos, resulta en una distribución equilibrada del α -cetoglutarato para la biosíntesis de glutamato y también para la producción de energía cuando la función respiratoria de *S. cerevisiae* aumenta en presencia de fuentes no fermentables de carbono (Figura 4), todo ello sin comprometer la producción de energía durante la respiración (Figura 5) [7].

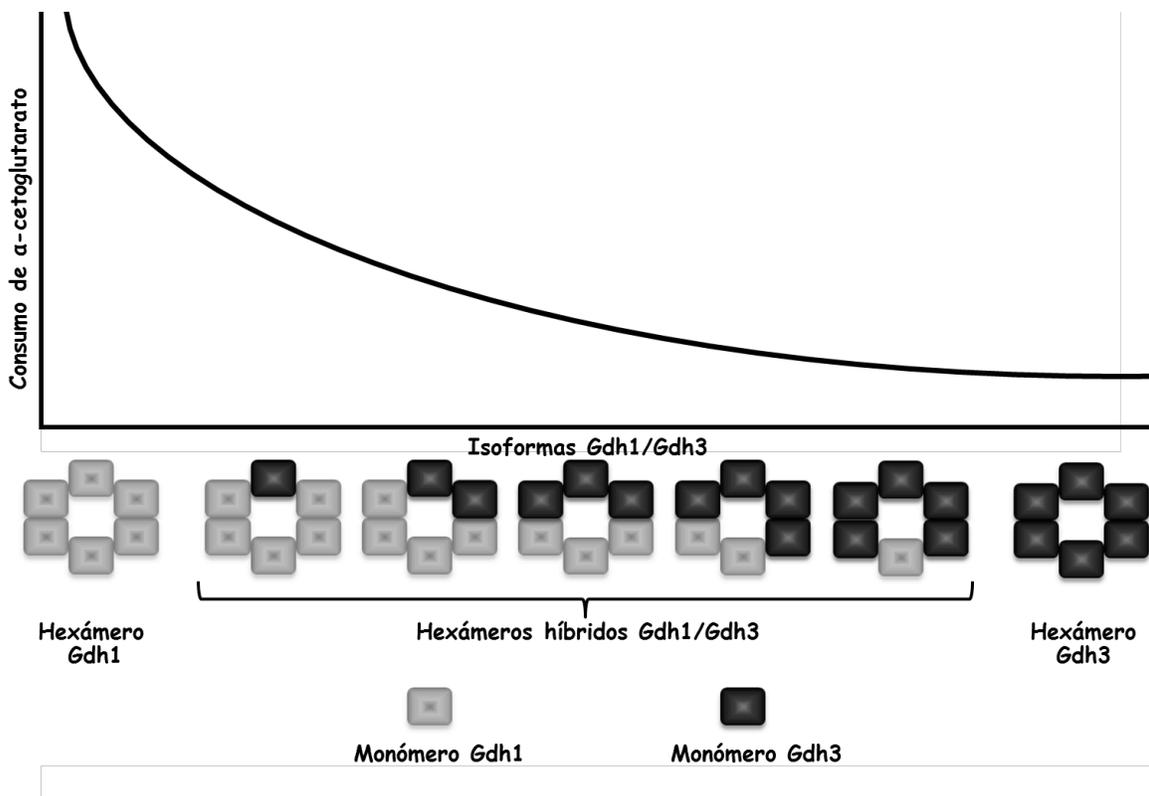


Figura 4. Las enzimas híbridas Gdh1 y Gdh3 están compuestas de hexámeros que poseen propiedades cinéticas distintas a las de los homohexámeros, la alta afinidad de Gdh1 por el α-cetoglutarato la hace una enzima ideal en condiciones fermento respiratorias, sin embargo, durante la respiración donde el α-cetoglutarato es importante como intermediario del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, hay una expresión de Gdh3 la cual tiene una afinidad menor por este sustrato, la formación de los heterómeros Gdh1/Gdh3 confiere a *S. cerevisiae* un uso equilibrado de los sustratos acorde al contexto metabólico.

Algo sumamente interesante relacionado con las Gdh en *Arabidopsis thaliana*, fue descubrir que existían enzimas híbridas compuestas de diferentes asociaciones monoméricas que cubrían todas las combinaciones posibles entre estas isoformas [23].

En resumen, la oligomerización de proteínas es un fenómeno universal que determina la capacidad de las proteínas para participar en una gran variedad de procesos celulares, tales como el aumento en la estabilidad de complejos, la modulación de la actividad enzimática, la transducción de señales y el transporte de iones y moléculas a través de la membrana celular, entre otras. El papel esencial que juega la oligomerización sugiere que existe una fuerte presión selectiva para mantener interfaces de interacción en todas las macromoléculas biológicas [24].

Relocalización subcelular de proteínas paralogas: su papel en la diversidad funcional

La localización subcelular de las proteínas juega un papel clave en su función [25], a tal punto, que se han reportado familias génicas en las que la diversificación funcional de sus productos básicamente lleva a una distribución diferencial de los mismos en compartimentos subcelulares [26].

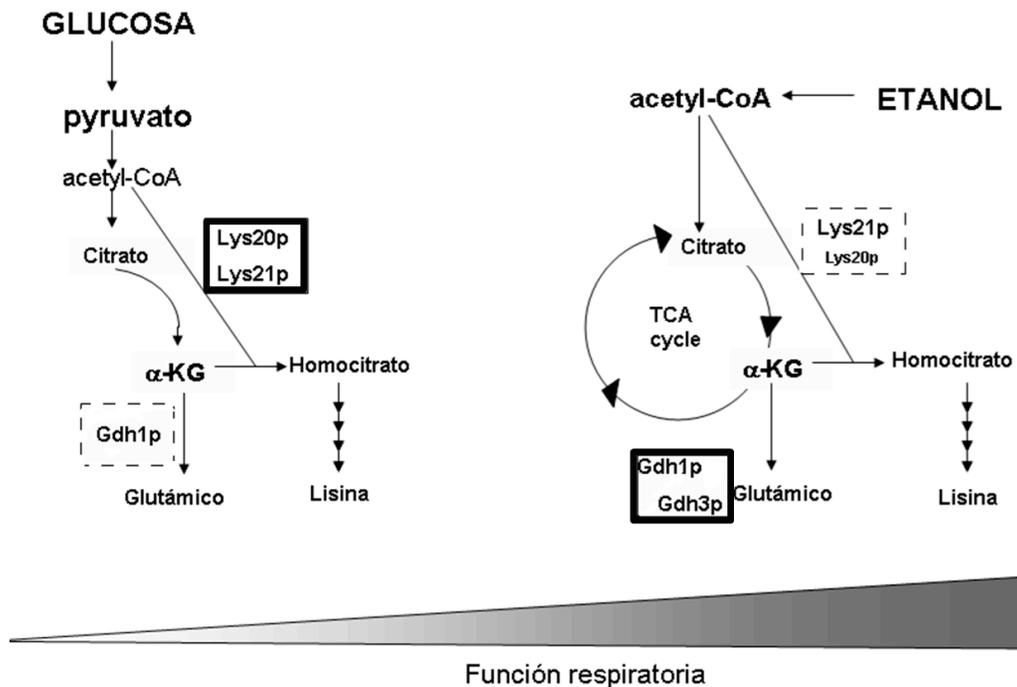


Figura 5. Papel de las enzimas parálogas Lys20, Lys21 y Gdh1, Gdh3 en el metabolismo facultativo de *S. cerevisiae*. Dependiendo del aumento en la función respiratoria, hay una modificación en la formación de hetero-oligómeros. Heterómeros Lys20/Lys21 prevalecen en condiciones fermento-respiratorias, mientras que en la función respiratoria sólo se encuentran hetero-hexámeros Gdh1/Gdh3. Los cuadros con líneas gruesas ilustran la formación de complejos híbridos y las líneas punteadas las isoformas predominantes (adaptado de Quezada *et al.*, 2008).

Posterior a los procesos de duplicación, las proteínas parálogas pueden presentar una localización subcelular distinta de la observada en la proteína “tipo ancestral”, esta relocalización contribuye a su diversificación funcional, ya que pueden encontrar nuevos interactores, concentraciones diferentes de sustratos y condiciones fisicoquímicas distintas en el nuevo compartimento [27]. Se ha demostrado que los péptidos que dirigen a las proteínas hacia nuevos compartimentos, evolucionan de dos a cinco veces más rápido que el resto de la región codificante, lo cual puede alterar la localización subcelular de una proteína duplicada con mayor facilidad y con ello facilitar la adquisición de nuevos interactores que modifiquen su función bioquímica en un tiempo relativamente corto. Un ejemplo donde la función que lleva a cabo una proteína está altamente influenciada por su localización subcelular, lo presenta la aminopeptidasa de zinc IDE, la cual degrada insulina y se expresa preferencialmente en el citosol; se ha demostrado que la adquisición de un péptido señal en la región N-terminal de IDE la dirige hacia mitocondria en donde tiene nuevos sustratos [28].

Existen una serie de estudios que indican que la localización mitocondrial de las proteínas que hoy en día conocemos, no refleja su origen evolutivo y que por tanto, la relocalización de vías metabólicas entre compartimentos subcelulares ha sido un tema recurrente en la evolución de los eucariontes. Un caso interesante lo representa la relocalización de la citrato sintasa de la mitocondria a los peroxisomas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La reconstrucción del metabolismo proto-mitocondrial ha demostrado que la mayoría de las proteínas que se derivaron del ancestro de la mitocondria no presentan una localización mitocondrial en las especies actuales [29].

La propensión de los genes duplicados a presentar patrones de localización diferencial depende en gran medida de la función biológica de los genes progenitores. Proteínas codificadas por genes de evolución lenta implicadas en tareas de mantenimiento (housekeeping), con altos niveles de expresión y proteínas involucradas en procesos biosintéticos, tienden a mantener el patrón de localización ancestral; en tanto que, proteínas del catabolismo y aquellas que participan en procesos que se pueden llevar a cabo en distintos compartimentos, presentan una mayor tendencia a relocalizarse. Una vez que las proteínas se encuentran en nuevos compartimentos, se adaptan a su nuevo ambiente adquiriendo nuevos papeles fisiológicos, cambiando sus propiedades fisicoquímicas, niveles de expresión y parejas de interacción (Figura 6) [30].

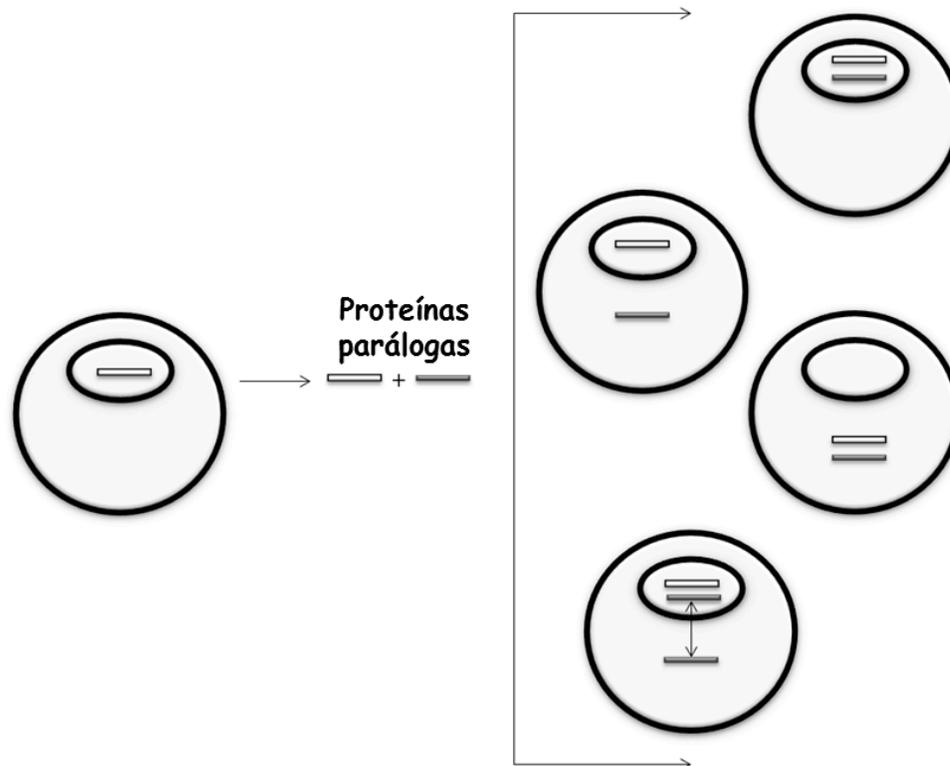


Figura 6. Relocalización de proteínas parálogas. Posterior a la duplicación pueden existir diversos escenarios: i) las proteínas pueden permanecer en el mismo compartimento de su antecesora, ii) alguna de ellas puede ganar una nueva localización, a través de la acumulación de mutaciones puntuales o por la adquisición o pérdida de una presecuencia, iii) que las dos tengan una nueva localización y iv) una de ellas permanece en el mismo lugar que la original, mientras que la segunda puede presentar dos localizaciones simultáneamente.

Existen una serie de eventos posteriores a la adquisición de nuevos sitios de localización, entre los que destacan:

- 1) Que no haya un efecto sobre la adecuación, 2) Que se tenga un efecto negativo en la adecuación y 3) que haya un efecto positivo en la adecuación del organismo.

En el primero el resultado puede ser que el gen duplicado se fije en la población. Alternativamente mutaciones subsecuentes en el péptido señal, pueden resultar en una segunda relocalización, dando una nueva oportunidad para que esta proteína pueda adquirir una nueva función. En el segundo escenario, el efecto negativo producido por la relocalización del

duplicado, puede resultar en su eliminación por selección purificadora. Y en el último caso, la proteína podría adquirir una nueva función bioquímica como resultado de esta localización; la selección purificadora actuaría previniendo mutaciones que puedan abolir o minimizar su función.

Subfuncionalización y relocalización subcelular

Un ejemplo sobre las implicaciones bioquímicas, fisiológicas y evolutivas que conlleva la relocalización de proteínas parálogas en levadura puede ilustrarse mediante el análisis comparativo de especies que presentan singletons (genes de una sola copia) vs especies que tiene genes duplicados y que han atravesado por procesos de relocalización.

En *S. cerevisiae* el último paso en la biosíntesis y el primero en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, son llevados a cabo por las enzimas parálogas Bat1 y Bat2 las cuales se originaron a partir del evento de duplicación total del genoma descrito con anterioridad. *Kluyveromyces lactis* pertenece a un linaje de levadura que se separó de *S. cerevisiae* antes de la duplicación total del genoma; *K. lactis* posee sólo un ortólogo copia de transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada denominada *K/Bat1*; experimentos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo demostraron que *K/Bat1* es una enzima bifuncional que participa en la biosíntesis y catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y que ese papel dual se ha repartido entre las enzimas parálogas Bat1 y Bat2. Bat1 es altamente expresada en condiciones biosintéticas, mientras que Bat2 se expresa en condiciones catabólicas.

Algo que resulta interesante, es que la relocalización diferencial de estas enzimas ha favorecido su función bioquímica y fisiológica dado que la localización de precursores está compartimentalizada diferencialmente. Los precursores biosintéticos abundan en la mitocondria, lugar donde se encuentra Bat1 y los sustratos para el catabolismo se encuentran preferencialmente en el citoplasma, justo donde se ha determinado la localización subcelular de Bat2. Las conclusiones de estos estudios demuestran que Bat1 y Bat2 tienen diferentes patrones de expresión y localización como resultado de la distribución biosintética y catabólica alguna vez presente en una Bat ancestral, optimizando de esta manera el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada [31].

Conclusiones

La redundancia génica es una característica común de todos los seres vivos. La duplicación de genes constituye una fuente de funciones nuevas o especializadas de las proteínas que codifican. Aquellos genes duplicados que se retienen pueden proveer una mayor dosis del mismo producto, o bien atravesar por un proceso de subfuncionalización, durante el cual ambas copias pierden algunas de las propiedades ancestrales adquiriendo nuevas características. La manipulación genética, molecular y genómica de la levadura *S. cerevisiae*, y la abundancia de genes parálogos que contiene su genoma, la convierten en un modelo ideal para el estudio de los procesos implicados en la diversificación de genes y productos parálogos.

Este trabajo muestra ejemplos de enzimas parálogas que se han subfuncionalizado a través de: i) la diversificación de los patrones de expresión de cada uno de los genes, ii) los cambios en la secuencia de la región codificante que resultan en modificaciones de las propiedades fisicoquímicas de las enzimas codificadas iii) en la capacidad de organizarse en homo y hetero-oligómeros y iv) la localización subcelular de las mismas. Tales casos, ponen de manifiesto la importancia de cada uno de estos mecanismos en la adquisición de nuevas propiedades que llevan a la subfuncionalización y a una mayor versatilidad enzimática. Asimismo, resaltan el hecho de que no todos los escenarios implican necesariamente la ocurrencia de expresión diferencial, modificación de propiedades cinéticas, hetero-oligomerización y relocalización. Por ejemplo, para el caso de productos en los que la hetero-

oligomerización juega un papel crucial, ambas proteínas tendrán que estar localizadas en el mismo compartimento. En un futuro será indispensable determinar la contribución de cada una de las instancias implicadas en el mantenimiento y la diversificación funcional de los genes duplicados y sus productos de síntesis.

Referencias

1. Darwin, C. (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favored Races in the Struggle for Life*. Murray, London
2. Müller, H.J. (1935) *Genetica* **17**, 237–252
3. Taylor, S.J. & Raes, J. (2004) *Annu. Rev. Genet.* **38**, 615–643.
4. Horowitz, N. H. (1945) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **31**, 153-157
5. Jensen, R. A. (1976) *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 409-425
6. Lynch, M. y Force, A. (2000) *Genetics.* **154**, 459-473
7. DeLuna, A., Avendaño, A., Riego., L. y González., A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 43775-437783
8. Contreras-Shannon. V., Lin A.P., McCammon, M.T. y McAlister-Henn, L. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 4469-4475
9. Lieberles, D y Dittmar, K. Eds. (2010) Wiley-Blackwell USA
10. Zhang, J. (2003) *TREE* **18**, 292-298.
11. Kafri, R., Levy, M y Pilpel, Y. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 11653-11658
12. Goffeau, A., *et al.* (1996) *Science.* **274**, 546-567
13. Wolfe, K. H. y Shields, D.C. (1997) *Nature.* **387**, 708-713
14. Friis, E. M., Chaloner, W. G. y Crane P. R. Eds. (1987) Cambridge University Press
15. Piskur, J., Rospedowska, E., Polakova, S., Merico, A. y Compagno, C. (2006). *Trends in genet.* **22**, 183-186
16. Andreeva, A. y Murzin, A. G. (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 399-408
17. Arvanitidis, A. y Heinisch, J. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 8911-8918
18. Lobo, Z. y Maitra, P. K. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 1444-1449
19. Keys, D. A. y McAlister-Henn, L. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 4280-4287
20. Feller, A., Ramos, F., Pierard, A. y Dubois, E. (1999) *Eur. J. Biochem.* **261**, 163-170
21. Quezada, H., Aranda, C., DeLuna, A., Hernández, H., Calcagno, M., Marín-Hernández, A., y González, A. (2008) *Microbiology.* **154**, 1656–1667
22. Avendaño, A., Riego, L., DeLuna, A., Aranda, C., Vázquez-Acevedo, M., Recillas-Targa, F., Valenzuela, L., Zonszein, S., Rodarte, B., Romero, G. y González, A. (2005) *Mol. Microbiol.* **57**: 291-305
23. Melo-Oliveira R, Oliveira, I.C., y Coruzzi, G. M. (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 4718–4723
24. Han, J. H., Batey, S., Nickson, A. A., Teichmann. S. A., y Clarke, J. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 319-330
25. Emanuelsson. O., y von Heijne, G. (2001) *Biochim. Biophys. Acta.* **1541**, 114-119
26. Schmidt, T. R., Doan, J. W., Goodman, M. y Grossman, L. (2003) *J. Mol. Evol.* **57**, 222-228
27. Byun-McKay S.A. y Geeta R. (2007) *TRENDS in Ecol. & Evol.* **22**, 338-344
28. Lessring, M. A., Farris, W., Wu, X., Christodoulou, D. C., Haigis, M. C., Guarente, L., *et al.* (2004) *The Biochemical journal*, **383**, 439-46
29. Gabaldon, T., y Huynen. M. A. (2003) *Science.* **301**, 609-612
30. Marques, A. C., Vinckenbosch, N., Brawand, D. y Kaessmann H. (2008) *Genome Biol.* **9**, R54
31. Colón, M., Hernández, F., López, K., Quezada, H. González, J. *et al.* (2011). *PLoS ONE*, **6**:e16099

Semblanza de la Dra. Maria Alicia González Manjarrez



La Dra. Maria Alicia González Manjarrez es Bióloga de la Facultad de Ciencias UNAM. Realizo sus estudios de Maestría y Doctorado dentro del Programa de Investigación Biomédica Básica. Actualmente es Investigador Titular C del Instituto de Fisiología, Celular. Su grupo se ha dedicado al estudio de la diversificación funcional de genes parálogos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de genes tipo ancestral y las implicaciones evolutivas de este proceso. Este trabajo, también ha llevado al grupo al estudio de interacciones entre activadores transcripcionales que determinan la organización de reguladores híbridos que resultan en una respuesta transcripcional peculiar y constituye una estrategia que permite ampliar el repertorio

de reguladores activos en *S. cerevisiae*. El trabajo del grupo ha quedado plasmado en más de 50 publicaciones, entre artículos y capítulos de libro. En su laboratorio se han graduado 12 Licenciados, 12 Maestros y 13 Doctores. La Dra. González ha impartido una multitud de cursos de Genética, Bioquímica y Biología Molecular en diferentes Facultades e Institutos de la UNAM. Asimismo, ha organizado en México 10 Cursos-Talleres internacionales procurando abordar temas novedosos, poniendo al alcance de estudiantes Latinoamericanos temas de frontera, facilitando así el acercamiento de los alumnos y de jóvenes investigadores a las nuevas herramientas de análisis que se han desarrollado a raíz de la secuenciación de genomas.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 39-52. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DEL NANOMOTOR QUE LE DA ENERGÍA A LA VIDA: LA F_1F_0 -ATP SINTASA

STRUCTURE AND FUNCTION OF THE NANOMOTOR THAT ENERGIZES LIFE: THE F_1F_0 -ATP SYNTHASE

José J. García Trejo, Mariel Zarco Zavala y Edgar Morales Ríos
Facultad de Química, Departamento de Biología, UNAM
Ciudad Universitaria, CP 04510, México DF
jjgartre@unam.mx

Resumen

La F_1F_0 ATP sintasa es un nanomotor molecular ubicuo que produce la mayoría de la energía química necesaria para todas las formas de vida. Se trata más que de una simple enzima, del factor de acoplamiento bioenergético más importante para la vida. Se conforma de dos nanomotores acoplados conformacionalmente; uno de ellos es el sector catalítico (F_1) que produce ATP a partir de ADP y P_i , el otro sector es un canal transmembranal (F_0) que produce un flujo de protones (o iones sodio) a través de las membranas transductoras de energía (membranas plasmáticas bacterianas, membrana interna mitocondrial y membrana tilacoidal de los cloroplastos). El mecanismo básico de acoplamiento entre ambos nanomotores se conserva en todas las formas de vida, es un mecanismo rotacional donde el flujo de protones a través del canal F_0 impulsa el giro del rotor central conectando F_1 con F_0 . Un estator periférico conecta ambos nanomotores para fijarlos entre ellos mientras el rotor central gira y al mismo tiempo alterna a los tres sitios catalíticos del sector F_1 en tres conformaciones, una que une ADP y P_i , otra que los condensa, y otra que libera al ATP de la F_1 , todo esto ocurre simultáneamente dirigido por el giro del rotor. Este nanomotor trabaja con una eficiencia de acoplamiento cercana al 100%, dado que prácticamente toda la energía que absorbe de los gradientes electroquímicos se transforma en ATP; por lo tanto es la máquina molecular más cercana a la perfección termodinámica en toda la naturaleza. Esto conlleva un funcionamiento reversible pues sintetiza ATP mientras el rotor central gira en contra de las manecillas del reloj (visto desde F_0 hacia F_1), y lo hidroliza cuando el rotor gira en el sentido contrario. Las preguntas centrales para descifrar el mecanismo de acoplamiento del nanomotor son las siguientes: ¿Cuál es la fuente de energía que impulsa el giro reverso del rotor en el nanomotor F_1 ?, ¿Cómo se regula el giro del rotor

central para favorecer la síntesis de ATP y prevenir su hidrólisis en las diferentes formas de vida?, ¿Cómo se estructura el nanomotor en las diferentes membranas transductoras de energía para producir suficiente ATP e impulsar la vida diaria en todas sus formas?. En nuestro laboratorio hemos contribuido a responder todas estas preguntas estudiando la cinética y energética de la rotación, así como la estructura y oligomerización del nanomotor en sus formas bacterianas y mitocondriales. Descubrimos no sólo la energía que impulsa la rotación de la F_1 , sino el mecanismo de regulación de esta rotación en mitocondrias, así como la estructura dimérica del nanomotor que promueve la formación de las crestas mitocondriales; recientemente también descubrimos una nueva proteína inhibitoria (subunidad ζ) presente en el nanomotor de todas las α -proteobacterias, lo cual abre un nuevo y fascinante mecanismo molecular de regulación del nanomotor bacteriano. El alto impacto de estos hallazgos abre nuevas preguntas y líneas de investigación con implicaciones importantes en la mecánica de los nanomotores, en la biogénesis mitocondrial y en la evolución del nanomotor más importante para la vida.

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

Abstract

The F_1F_0 ATP synthase is a ubiquitous nanomotor that produces most of the chemical energy required by all forms of life. More than a simple enzyme, it is the most important bioenergetic coupling factor of life. It is conformed by two conformationally-coupled nanomotors; one of them is the catalytic sector (F_1) that produces ATP from ADP and P_i , the other one is a transmembranous channel (F_0) that produces a proton flow (or sodium flow) through the energy transducing membranes (bacterial plasma membranes, mitochondrial inner membranes and thylacoidal chloroplast membranes). The basic coupling mechanism between both nanomotors is conserved in all forms of life, it is a rotational mechanism where the proton flow through F_0 drives gyration of the central rotor connecting F_1 with F_0 . A peripheric stator connects both nanomotors to fix them with one another while the central rotor spins and simultaneously alternates the three catalytic sites of F_1 in three different conformations, one that binds ADP and P_i , another that condenses them, and a third one that releases ATP from F_1 , all of this takes place simultaneously driven by the gyration of the central rotor. This nanomotor works with a coupling efficiency near to 100%, since it transforms essentially all the energy that absorbs from electrochemical gradients into ATP; therefore it is the molecular machine closest to thermodynamic perfection in all nature. This also implies a reversible functioning since it synthesizes ATP while the central rotor spins counterclockwise (viewed from F_0 to F_1), and it hydrolyzes it when the rotor rotates in the clockwise direction. The key questions to resolve the coupling mechanism of the rotor are the following: ¿Which is the energy source that drives the counterclockwise spinning of F_1 ?, ¿How is the gyration regulated at the central rotor to favor ATP synthesis over its hydrolysis in all forms of life?, ¿How is the nanomotor structured in the different energy transducing membranes to produce enough ATP thus driving daily life in all its forms? In our laboratory we have contributed to answer all these questions by studying the kinetics and energetics of rotation, and the structure and oligomerization of the nanomotor in its bacterial and mitochondrial forms. We discovered not only the driving energy of F_1 rotation, but also the mechanism that controls this rotation in mitochondria, together with the dimeric structure of the nanomotor that promotes formation of the mitochondrial cristae; more recently we also discovered a novel inhibitory protein (ζ subunit) present in the nanomotor of all α -proteobacteria unveiling a new and fascinating molecular regulatory mechanism of the bacterial nanomotor. The high impact of these findings opens new

questions and research lines with important implications in the mechanics of nanomotors, in mitochondrial biogenesis, and in the evolution of the most important nanomotor of life.

Keywords: ATP synthase, nanomotor, rotation, α -proteobacteria, dimerization.

Introducción

La ATP sintasa es el nanomotor ubicuo que sostiene bioenergéticamente a todas las formas de vida al proporcionar la mayoría del ATP necesario para impulsar todas las reacciones endergónicas necesarias para la vida. Dado que la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, es una reacción termodinámicamente desfavorable o endergónica, la F₁F₀ ATP sintasa de todos los organismos acopla esta síntesis que ocurre en su parte catalítica F₁ al transporte de protones por su canal F₀ impulsado por el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$). Este último es mantenido por las cadenas respiratorias o fotosintéticas de las membranas transductoras de energía mencionadas arriba. Esta enzima es entonces ubicua y esencial para la vida en todas sus formas, es el motor molecular más pequeño de la naturaleza que funciona con un mecanismo rotacional cuya eficiencia de acoplamiento energético es cercano al 100% [1]. De acuerdo a la teoría quimiosmótica este acoplamiento se describe por la siguiente ecuación:

$$\Delta G = n\Delta\mu_{H^+} + \Delta G_{ATP} \quad [1]$$

donde n es el coeficiente estequiométrico H⁺/ATP o el número protones transportados por F₀ por cada ATP sintetizado en F₁. $\Delta\mu_{H^+}$ es la diferencia de potencial electroquímico de protones a través de la membrana:

$$\Delta\mu_{H^+} = F\Delta\Psi - 2.3 RT\Delta pH \quad [2]$$

En donde F es la constante de Faraday, $\Delta\Psi$ y ΔpH son, respectivamente, las diferencias de potencial eléctrico y de pH a través de las membranas transductoras de energía, y ΔG_{ATP} es el cambio de energía libre asociada a la síntesis del ATP. En la situación ideal de un acoplamiento al 100% (es decir con una membrana impermeable a los protones y el total de las F₁F₀-ATP sintasas bien acopladas entre sus sectores F₁ y F₀), el ΔG de acoplamiento de la Ec. 1 es cero, dado que toda la energía del $\Delta\mu_{H^+}$ lo usa el complejo F₁F₀ para sintetizar ATP. Dado que con esta premisa se han obtenido los valores de n descritos en la Fig.1, esto implica que el nanomotor es casi 100% eficiente.

Cuando los protones atraviesan la membrana a través de F₀, hacen girar un barril de 8-15 copias (variable entre especies) de la subunidad protonable (denominada “c” en bacterias, “III” en cloroplastos o “9” en mitocondrias). Este barril de subunidades protonables está unido a un cuello central giratorio que induce los cambios conformacionales alternantes de los 3 sitios catalíticos en las interfases α/β de la F₁ que a su vez impulsan la liberación del ATP recién sintetizado de la enzima. Dado que este motor molecular tiene una eficiencia de aproximadamente 100% en su acoplamiento energético, el valor de n fluctúa entre 2.7 y 4.7 (8-15 Sub. c/3 sitios catalíticos), lo cual en general concuerda con los valores determinados experimentalmente (Fig. 1).

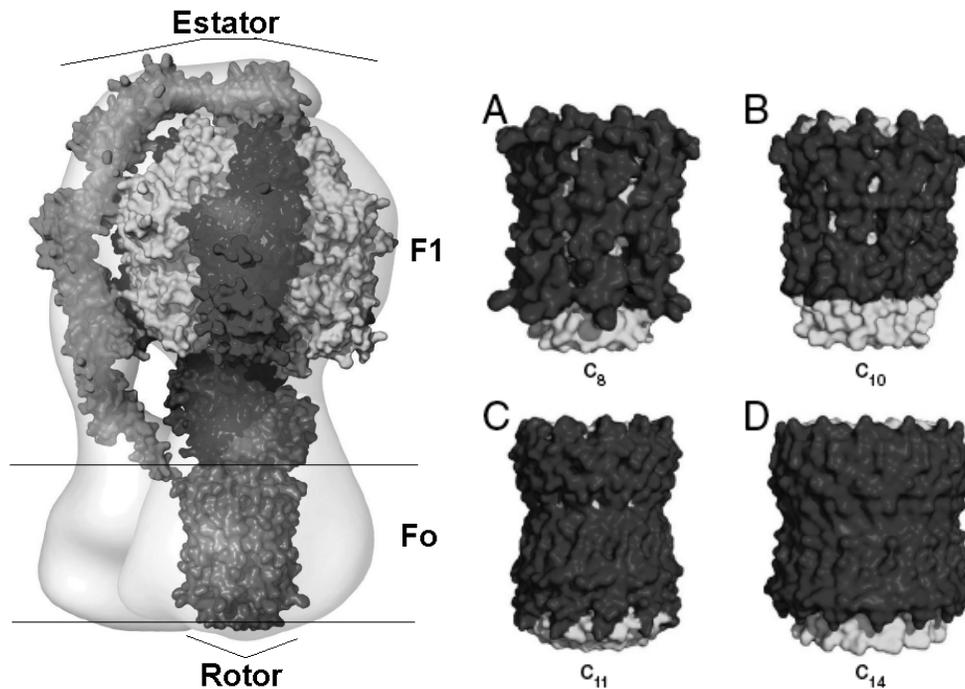


Figura 1. Estructura de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial de corazón de bovino y oligómero de subunidades c en varias especies. La figura del lado izquierdo muestra el rotor central con el anillo de 8 subunidades c unido al cuello central de la enzima. El estator lo conforma las subunidades α/β del sector F_1 (en gris claro y oscuro alternadas) unidas al cuello lateral de la enzima (gris intermedio). Los protones se transportan de acuerdo a su gradiente electroquímico por la interfase a/c_{8-15} y hacen girar al rotor para impulsar la liberación del ATP sintetizado de los tres sitios catalíticos de la F_1 . La sombra gris es la superficie de la molécula observada por microscopía electrónica. A la derecha, varios canales de protones con 8-14 subunidades c por oligómero: A) c_8 en bovino; B) c_{10} en levadura; C) c_{11} en *Ilyobacter tartaricus*; D) c_{14} en *Spinacea oleracea*. Estas variaciones cambian la estequiometría H^+/ATP (n) entre 2.7 y 4.7. Modificado de Watt y cols., 2010 [2].

El ahora premio Nobel Paul D. Boyer [3] fue el primero en proponer que la alternancia de los tres sitios catalíticos de la F_1 se explicaba por medio de la rotación de alguna(s) de las subunidades no catalíticas (γ , δ y/o ϵ), respecto a las tres copias de heterodímeros α/β que comprenden la parte simétrica de la F_1 (ver Fig. 1). Por lo tanto, en un sentido de la rotación se produciría la síntesis de ATP y en el otro sentido, su hidrólisis. La primera evidencia fuerte a favor de esta hipótesis provino de la resolución atómica de las dos α -hélices N- y C-terminales de la subunidad γ , las cuales forman una trenza antiparalela que se extiende como un eje central entre el hetero-hexámero $\alpha_3\beta_3$ de la F_1 -ATPasa. Posterior a esto, la rotación de las subunidades del cuello central de la F_1 se demostró por medio de diseño e ingeniería de puentes disulfuro rotor-estator que bloquearon por supuesto la actividad de la enzima, así como por la pérdida de la anisotropía de la fluorescencia después del fotoblanqueo de sondas fluorescentes unidas covalentemente a la subunidad γ (revisado en la ref. 3). Sin embargo, la evidencia más contundente de esta rotación provino de la observación directa de esta rotación por medio del marcaje de la subunidad γ con un filamento fluorescente de actina susceptible de observarse y video grabarse en un microscopio de fluorescencia de alta resolución. Las moléculas individuales de la F_1 inmovilizadas “de cabeza” en una placa de níquel por medio de extensiones de histidinas en los extremos N-terminales de las subunidades α o β , permitieron observar una

rotación continua de la subunidad γ inducida por la hidrólisis del ATP que ocurre siempre en el sentido opuesto a las manecillas del reloj [1]. Después de estos experimentos pioneros, han surgido muchos otros que han completado el cuadro demostrando que las subunidades que giran son las del cuello central (γ, ϵ y c en la enzima bacteriana). No sólo eso, sino que se ha demostrado que este giro ocurre en 3 etapas de 120° las cuales a su vez se subdividen en dos movimientos angulares de 90° y 30° asociados a la unión del nucleótido y a la liberación del P_i , respectivamente [1,4]. Durante la rotación en el sentido opuesto (de acuerdo a las manecillas del reloj visto desde F_0 hacia F_1) la enzima es capaz de sintetizar ATP de manera impulsada por el flujo de protones por F_0 y por la energía de unión del ADP y del P_i [4]. En este sentido, es clave el movimiento rotacional del anillo de subunidades c , el cual forma una interfase con la subunidad a por la cual se transportan los protones. El modelo más aproximado de este proceso es como sigue (revisado en [5]). Cada protón entra por un hemi-canal de la subunidad a , luego protona a un carboxilo esencial de una subunidad c , el cual da toda la vuelta de casi 360° conforme el flujo de protones impulsa al anillo de subunidades c , hasta salir por otro hemi-canal de la subunidad a hacia el otro lado de la membrana. La demostración de esta rotación del cuello central, hizo necesario buscar la existencia de otro cuello periférico que funcionara como ancla de la F_1 a la membrana y así permitir que el giro del cuello central induzca la alternancia de los tres sitios catalíticos. Experimentos de microscopía electrónica de alta resolución resolvieron la presencia de este segundo cuello lateral el cual se conecta a la F_1 por medio de la subunidad δ de *E. coli* o también llamada OSCP en la enzima de bovino (revisado en [5]). Aunque la resolución de la estructura de la base del estator de F_0 espera a estudios de mayor resolución, el mecanismo rotacional F_1F_0 -ATP sintasa está bien establecido y conforma uno de los factores de acoplamiento mejor diseñados en toda la naturaleza.

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

Como todo motor molecular, el complejo F_1F_0 es reversible, es decir, funciona tanto en el sentido de la síntesis como en el de la hidrólisis del ATP. Cuando el $\Delta\mu_{H^+}$ se colapsa parcial o totalmente, la energía libre disponible para impulsar la síntesis de ATP disminuye (ver Ec. 1), por lo tanto se favorece la actividad de F_1F_0 -ATPasa la cual tiende a restablecer el $\Delta\mu_{H^+}$ al bombear protones en el sentido reverso. El colapso del $\Delta\mu_{H^+}$ ocurre por ejemplo durante la anoxia (durante periodos isquémicos en los tejidos de eucariontes complejos, o en ambientes con bajas presiones parciales de oxígeno en el caso de bacterias o eucariontes simples) o durante la oscuridad en los cloroplastos y bacterias fotosintéticas. En estas condiciones, se favorece termodinámicamente el giro del rotor en el sentido de la hidrólisis del ATP lo cual consume al ATP de las células. Por lo tanto, la naturaleza ha diseñado o modificado a algunas subunidades de la enzima para inhibir a la actividad de F_1F_0 -ATPasa y permitir o favorecer la de F_1F_0 -ATP sintasa. En general, al disminuir el $\Delta\mu_{H^+}$, algunas subunidades o dominios inhibitorios se estructuran de tal manera dentro del rotor de la enzima que impiden el giro del cuello central impulsado por la unión del ATP (revisado en [5]). En bacterias, esta función inhibitoria la lleva a cabo la subunidad ϵ que funciona como un trinquete, es decir, una estructura que favorece el giro del cuello central de la F_1 en el sentido de la síntesis, pero lo inhibe en el de la hidrólisis. Por otro lado, en los cloroplastos la oxidación de un puente disulfuro de la subunidad γ en condiciones oscuridad inhibe su rotación y la reducción del mismo puente durante la iluminación incrementa la velocidad de rotación del cuello central de la F_1 , restableciéndose así la fotofosforilación (revisado en [5]).

Una de las preguntas importantes en cuanto a la evolución de los sistemas de regulación de la ATP sintasa, es cómo ha sido la transición evolutiva de las subunidades inhibitorias desde bacterias hasta mitocondrias, dado que a diferencia de la subunidad ϵ de la ATP sintasa bacteriana, otra subunidad diferente o proteína inhibidora (IF_1 , ver más adelante) previene la actividad de hidrólisis del complejo F_1F_0 mitocondrial. Para tratar de resolver cómo ha sido esta

transición en el control de la ATP sintasa, hemos estudiado la cinética y estructura de la ATP sintasa de la α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans*, la cual está relacionada filogenéticamente con el protoendosimbionte que dio origen a las mitocondrias [6,7]. Además, *P. denitrificans* se ha utilizado como modelo para aislar y estudiar a los demás complejos respiratorios debido a su relativa simplicidad comparado con los complejos mitocondriales. Adicionalmente, la ATP sintasa de *P. denitrificans* tiene la peculiaridad de ser la ATP sintasa más rápida que se ha descrito, y la ATPasa más lenta o latente, esto se refleja en su cociente de actividades ATP sintasa/ATPasa que es de entre 20-60 [8-10], mientras que el mismo cociente de las enzimas de eubacteria o de mitocondria (o cloroplasto) es menor o cercano a la unidad; es decir, el resto de las ATP sintasas sintetizan o hidrolizan al ATP a una velocidad similar mientras que la enzima de *P. denitrificans* es prácticamente una ATP sintasa unidireccional. Debido a esto, nuestro grupo ha estado interesado en responder la incógnita de cómo es el mecanismo de regulación de esta ATP sintasa de *P. denitrificans* que le permite sintetizar al ATP a gran velocidad, y a su vez bloquea en su actividad hidrolítica.

Después de aislar por primera vez a los complejos F_1 y F_1F_0 de *P. denitrificans*, (PdF_1 y PdF_1F_0) descubrimos una sexta subunidad de 11 kDa asociada a la PdF_1 adicional a las 5 subunidades canónicas de las F_1 -ATPasas bacterianas ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$, y ϵ). Esta proteína se encontró también asociada al complejo PdF_1F_0 , el cual se purifica con un método diferente al usado para aislar a la PdF_1 , lo cual indicó que esta sexta subunidad de la PdF_1 es una subunidad estructural del complejo PdF_1F_0 . Casualmente esta proteína co-migra en geles desnaturalizantes con la proteína inhibidora (IF_1) de la ATP sintasa mitocondrial [10], y dado el alto grado de control de la ATP sintasa de *P. denitrificans* que favorece su actividad sintética sobre la hidrolítica, hipotetizamos que esta sexta subunidad de la PdF_1 podría ser una proteína inhibidora propia de esta ATP sintasa bacteriana. Dado su peso molecular y migración en geles desnaturalizantes, denominamos a esta proteína como subunidad ζ en orden decreciente al peso molecular respecto a la subunidad ϵ . Después de clonarla y obtener a la proteína recombinante, ensayamos el efecto de esta proteína en la actividad de ATPasa de la PdF_1F_0 ATPasa de partículas sub-bacterianas (PSB, vesículas invertidas de la membrana plasmática de las bacterias, donde la parte catalítica F_1 queda expuesta al medio acuoso), y también en la PdF_1 -ATPasa soluble aislada, ambas preparaciones activadas con sulfito. De acuerdo a nuestra hipótesis regulatoria para esta subunidad ζ , corroboramos tanto en la PdF_1 -ATPasa como en el complejo PdF_1F_0 de las PSB que esta proteína es un potente inhibidor de la actividad de ATPasa de la enzima de *P. denitrificans* incluso en condiciones de fuerte activación de la enzima en presencia del oxianión sulfito [10].

De manera interesante, encontramos también que la subunidad ϵ no ejerce función inhibitoria en la PdF_1 -ATPasa o en la PdF_1F_0 -ATPasa, lo cual sugiere fuertemente que en *P. denitrificans* existe un mecanismo de regulación de la ATP sintasa diferente al de la subunidad ϵ , y que esta última no participa de manera esencial en la inhibición de la PdF_1 -ATPasa. Es entonces muy probable que la subunidad ζ que encontramos represente un mecanismo de control del nanomotor bacteriano totalmente diferente al mecanismo de trinquete que se ha propuesto para la subunidad ϵ en eubacterias. De manera relevante, también encontramos que el gen para esta proteína existe como marco de lectura abierto en todas las α -proteobacterias además de *P. denitrificans*, y verificamos que la misma subunidad ζ se expresa unida a la ATP sintasa de otra α -proteobacteria como lo es *Rhodobacter sphaeroides* [10]. Esto implica que este nuevo mecanismo de control con la subunidad ζ no es exclusivo de *P. denitrificans* y existe como tal en toda la familia de las α -proteobacterias. Adicionalmente, secuenciamos tanto a la proteína correspondiente a la subunidad ζ recombinante como al ADN del gen amplificado a partir de ADN genómico de *P. denitrificans*, y encontramos que esta subunidad no tiene similitud significativa con otras subunidades regulatorias como lo son ϵ en eubacterias o la IF_1 mitocondrial, con la excepción del extremo N-terminal de ζ que es similar al dominio inhibitorio de la IF_1 mitocondrial, pero esta última similitud parece ser de baja significancia. Esto sugiere fuertemente que la subunidad ζ de la ATP sintasa de α -proteobacterias no es un predecesor

evolutivo de la F_1 mitocondrial, aunque no descarta del todo esta posibilidad. Este hallazgo abre una línea nueva de investigación para resolver el mecanismo intrínseco del nanomotor ATP sintasa en la amplia familia de α -proteobacterias, y permitirá conocer en un futuro cómo han ido evolucionando los mecanismos de control de la ATP sintasa desde bacterias hasta las mitocondrias.

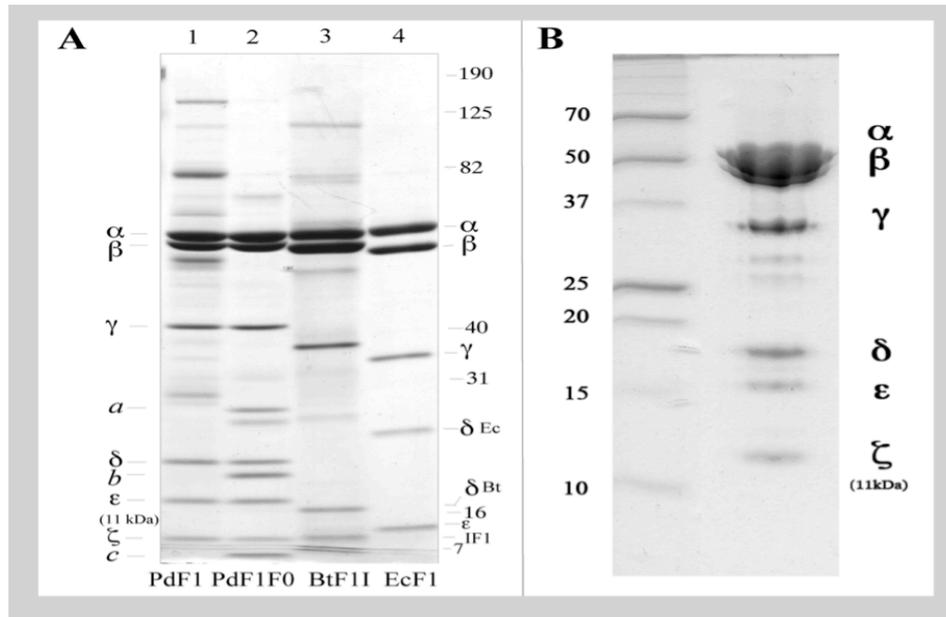


Figura 2. Una nueva proteína inhibidora o subunidad ζ en la ATP sintasa de *P. denitrificans* y el resto de las α -proteobacterias. Gels desnaturalizantes mostrando a la nueva subunidad ζ en la PdF_1F_0 y PdF_1 -ATPasas. A) Los carriles muestran de izquierda a derecha, a la PdF_1 , PdF_1F_0 , el complejo F_1 - IF_1 de corazón de bovino (Bt F_1 I) y la F_1 -ATPasa de *Escherichia coli* (Ec F_1), mostrando que la nueva proteína inhibidora ζ está asociada tanto a la PdF_1 como a la holoenzima de *P. denitrificans* (PdF_1F_0), y comigra con la IF_1 mitocondrial. B) El gel separa en forma desnaturalizante una preparación de la PdF_1 -ATPasa mostrando la posición de la subunidad ζ respecto a las cinco subunidades canónicas observadas en todas las F_1 -ATPasas (α , β , γ , δ , y ϵ). Modificado de Morales-Ríos y cols., 2010 [10].

Recientemente, encontramos por difracción circular que la estructura secundaria de la subunidad ζ es 100% α -hélice (Zarco-Zavala, Morales-Ríos, Ramírez-Silva, Mendoza-Hernández, y García-Trejo, en preparación); sin embargo necesitábamos otros métodos para resolver la estructura terciaria de esta proteína. Alineando algunos segmentos por amplificar del gen de esta proteína encontramos en línea una estructura en 3D resuelta para esta misma proteína pero proveniente de otra α -proteobacteria por medio de resonancia magnética nuclear (NMR), con lo cual pudimos construir un modelo en 3D de la subunidad ζ de *P. denitrificans* el cual sirve como modelo estructural de trabajo. Por ejemplo, podemos interpretar mejor los sitios expuestos de esta proteína a proteólisis limitada y esto nos ha permitido encontrar que en condiciones de activación de la F_1 -ATPasa de *P. denitrificans* con sulfito, la subunidad ϵ se oculta mientras que la subunidad ζ se expone más a esta proteólisis; además, la proteólisis preferencial de ζ en presencia de sulfito incrementa la actividad de PdF_1 -ATPasa, lo cual corrobora que la subunidad ζ es la subunidad inhibitoria principal de la F_1F_0 -ATPasa de *P. denitrificans* y muy probablemente en el resto de las α -proteobacterias, sugiriendo que ζ substituye a ϵ como proteína inhibidora de la F_1F_0 -ATPasa en esta familia de bacterias.

Experimentos de entrecruzamiento sugieren que durante la activación de la PdF₁-ATPasa con sulfito, la subunidad ζ se mueve de una posición cercana a las subunidades catalíticas (α/β) del estator, hacia otra posición probablemente cercana al rotor. Esto, también sugiere que ζ es probablemente otra proteína regulatoria que interfiere directamente con la rotación intrínseca de la F₁F₀-ATPasa en α -proteobacterias. En resumen, descubrimos un nuevo mecanismo de control del nanomotor ATP sintasa en la familia de las α -proteobacterias.

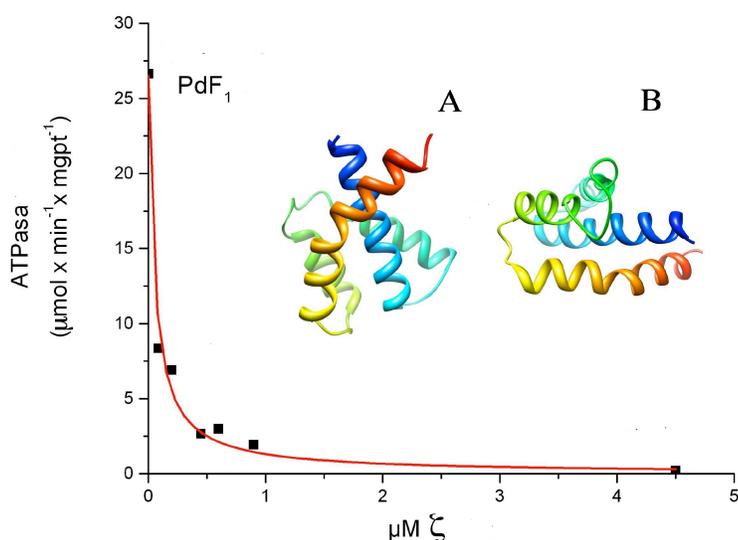


Figura 3. Inhibición de la actividad de ATPasa ejercida por la subunidad ζ en la PdF₁-ATPasa y estructura de la subunidad ζ . Curso temporal de actividad de PdF₁-ATPasa Se reconstituyó a las subunidades ϵ y ζ recombinantes de *P. denitrificans* en la PdF₁-ATPasa. Se añadió un exceso de ϵ y las concentraciones indicadas de la subunidad ζ . La subunidad ϵ no inhibió la actividad basal de la PdF₁-ATPasa, sino que la incrementó ligeramente (el punto a la concentración de $\zeta=0$). Concentraciones crecientes de ζ inhibieron a la PdF₁-ATPasa con una cinética de inhibidor no competitivo total lo cual se verificó por el ajuste no lineal mostrado por la línea roja. Insertos: modelo estructural de la subunidad ζ resuelto por alineamiento estructural a partir de la proteína homóloga aislada de la α -proteobacteria *Jannaschia sp.*, estructura resuelta en solución por resonancia magnética nuclear. A) Vista frontal de los extremos C-terminal (α -hélice roja) y N-terminal (α -hélice azul) con el dominio globular intermedio hacia atrás. B) Vista lateral de ambas hélices N y C terminales mostrando el dominio globular intermedio a la izquierda con su estructura de toda α -hélice.

Por otro lado, en mitocondrias también existe una subunidad inhibidora (IF₁) que durante el colapso del $\Delta\mu_{H^+}$ impide la actividad de la F₁F₀-ATPasa. Esta subunidad de 10 kDa se une a la F₁ con una estequiometría de 1:1 a distancia de entrecruzamiento del dominio C-terminal de la subunidad β y también con la subunidad α de la F₁ (revisado en [5]). Esto sugirió por muchos años que el mecanismo de acción de esta proteína era el de bloquear los cambios conformacionales de la subunidad β que son necesarios para la catálisis, uniéndose a través de su dominio N-terminal inhibitorio en alguna interfase α/β (11). Sin embargo, nosotros demostramos que la IF₁ también entrecruza a una distancia $\leq 12\text{\AA}$ con las subunidades del rotor γ y ϵ tanto en la F₁ soluble como en la F₁F₀-ATP sintasa completa [12]. Esto implicó que la IF₁ podría interferir no sólo con los cambios conformacionales de las subunidades β , sino también con el giro del rotor o cuello central de la enzima [12]. Aunque esto lo confirmó posteriormente el

grupo del premio Nobel John E. Walker al observar que el dominio N-terminal de la IF₁ interactúa directamente con la subunidad γ en el cuello central del complejo F₁-I de bovino en su estructura cristalina [13], la pregunta que permanece abierta, es ¿cómo se mueve la proteína inhibidora en condiciones de síntesis de ATP, es decir en presencia del $\Delta\mu_{H^+}$, ADP y Pi, para permitir el giro del cuello central?. Algunos grupos sostienen que la IF₁ se disocia de la ATP sintasa en estas condiciones de síntesis de ATP; sin embargo, otros grupos han mostrado que la IF₁ se mantiene unida a la F₁F₀-ATP sintasa en una posición no inhibitoria en presencia del $\Delta\mu_{H^+}$ (revisado en [5]). En algunos experimentos no publicados aún, hemos confirmado que la IF₁ se mueve dentro de la enzima en una posición que podría permitir el giro del rotor, sin disociarse de la parte F₁ de la enzima.

Por otro lado, el extremo C-terminal de la IF₁ que no es esencial para la inhibición, contiene dominios de dimerización e induce la formación de homodímeros a través de sus α -hélices antiparalelas que a su vez inducen dimerización de la F₁-ATPasa soluble [14]. Estos resultados abrieron la pauta para investigar si esta dimerización se extendía o no a la ATP sintasa completa, es decir si existía una especie dimérica de la F₁F₀-ATP sintasa en las mitocondrias y si ésta se formaba o no en respuesta a la asociación de la IF₁.

La F₁F₀-ATP sintasa se homo-dimeriza y esto contribuye a la formación de las crestas de la membrana interna mitocondrial

Por medio de electroforesis en geles azules nativos en presencia de detergentes suaves y su resolución en dos dimensiones, recientemente se ha descrito la existencia de agregación homóloga y heteróloga de varios complejos mitocondriales, incluyendo a los complejos I, III y IV además de un dímero complejo V que corresponde a la ATP sintasa [15]. Muy probablemente la dimerización de la F₁F₀ ATP sintasa le confiere mayor estabilidad estructural y mayor eficiencia a su mecanismo rotacional si la interfase del dímero la forman los estatores o cuellos laterales de cada monómero. Este arreglo debe ayudar a resistir la inercia rotacional del cuello central sin impedir su giro (Ver Fig. 1). Sin embargo, la evidencia funcional y estructural que corrobore estas posibles ventajas funcionales y estructurales para la enzima apenas comienzan a surgir.

Para determinar si la IF₁ participa en la dimerización de la F₁F₀-ATP sintasa completa, varios grupos se dieron a la tarea de remover física o genéticamente a la IF₁ y ver el efecto en la dimerización de la enzima. Aparentemente, se encontró en la enzima de *Saccharomyces cerevisiae* que a pesar de que se haya removido a la IF₁, la enzima completa mantenía su capacidad de dimerizarse. Sin embargo, la remoción de otras subunidades de F₀ denominadas e y g, eliminaron casi por completo la dimerización de la enzima [16, [17] y sorpresivamente en paralelo se perdieron las crestas mitocondriales [18]. Esto se reprodujo con varias mutantes que están alteradas en la dimerización o tetramerización de la ATP sintasa [19]. En conjunto, estos resultados implican que el dímero de la enzima completa se forma primordialmente a través de interacciones entre los canales F₀ de protones por medio de subunidades como e y g, y además que la polimerización de la enzima a partir de sus dímeros, controla e induce la formación de las crestas mitocondriales.

¿Cómo ocurre este proceso? La respuesta se encuentra probablemente en un modelo inicial de Allen [20], quien al observar a polímeros de la ATPasa en las crestas mitocondriales de *Paramecium* propuso la forma “cónica” de un dímero hipotético de la F₁F₀-ATPasa induce la curvatura de la membrana al polimerizarse. Así, un primer brote se transforma en una cresta tubular cuando la cadena de dímeros de la ATP sintasa se enreda en forma helicoidal alrededor de las crestas [20] (ver Fig. 3B). Este modelo se ha reforzado con los estudios recientes con la ATP sintasa de levadura en donde se ha encontrado que las subunidades dimerizantes del canal F₀ (e, g y b) forman dos interfases que le dan forma a la cadena de dímeros de la ATP sintasa en las crestas [18,19]. Sin embargo, estas hipótesis no tenían una base estructural hasta que no se resolviera la estructura general del dímero de la F₁F₀-ATP sintasa.

Estructura del dímero de la ATP sintasa: la base estructural que le da forma a las crestas mitocondriales

La primera estructura del dímero de la ATP sintasa, la resolvimos en colaboración con el Dr. Stephan Wilkens entonces en la University of California at Riverside, USA, al obtener una preparación soluble del dímero de la enzima de corazón de bovino en presencia de digitonina con lo cual logramos alinear y promediar una gran cantidad de imágenes obtenidas (aprox. 1100 imágenes individuales) por microscopía electrónica de la vista “lateral” del dímero. Este análisis dio como resultado una estructura promedio que mostró a dos monómeros en contacto muy cercano uno del otro en sus sectores F_0 [21], como se esperaba de los resultados bioquímicos.

En el dímero de la ATP sintasa, ambos canales F_0 hacen los contactos más fuertes de la interfase dimerizante. En el otro extremo, las porciones F_1 se separan al menos unos 10 Å, de tal manera que los dos ejes más largos que atraviesan longitudinalmente a cada monómero se inclinan con un ángulo de 40° entre sí [21]. Esto da como resultado una geometría “cónica” con la parte más angosta del lado de la membrana, y la parte más abierta del lado de las porciones F_1 (Fig. 4). La gran implicación es que si este dímero se polimeriza, esto promueve una mayor curvatura en la membrana acorde con el arreglo angular de este polímero (que por el momento se desconoce). En otras palabras, como propuso Allen [20], el dímero “cónico” de la ATP sintasa es la base estructural a partir de la cual se genera la curvatura de las crestas mitocondriales.

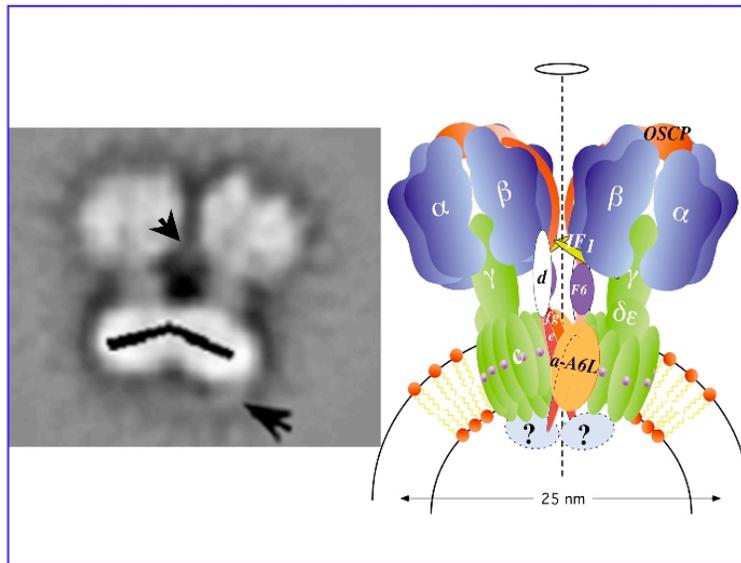


Figura 4. Estructura del dímero de la ATP sintasa de corazón de bovino. A la izquierda se muestra la vista “lateral” del dímero de la ATP sintasa de mitocondrias de bovino resuelto por microscopía electrónica y análisis promedio de imágenes individuales. Las flechas del lado izquierdo indican los puentes F_1 - F_1 y F_0 - F_0 que estabilizan al dímero. Ambos monómeros se inclinan 40° como se muestra en las líneas negras sobre las porciones F_0 . El modelo de la derecha es similar a la Fig. 1 pero enfatiza la curvatura de la membrana que impone esta estructura angular, donde los rotores de cada monómero (verde) con sus respectivos estatores y subunidades dimerizantes (naranja) y en azul las partes F_1 . Se propone que la IF_1 forma parte de la interfase dimerizante F_1 - F_1 . Modificado de la referencia [21].

Además de esto, observamos dos puentes proteicos que conectan por un lado a los sectores F_1 del lado de la matriz mitocondrial, y por otro a los sectores F_0 del lado del espacio intermembranal. El puente F_1 - F_1 podría estar formado por una estructura cruzada del dímero de la IF_1 (Fig. 4) y/o por subunidades de los cuellos laterales de la enzima. Por otro lado, el puente

colgante entre los sectores F_0 puede formarse por las subunidades dimerizantes e y/o g cuyos sectores intra y extramembranales contienen dominios dimerizantes. Experimentos de reconstitución [22] y sobre-expresión de la IF_1 de hígado de rata [23] de nuestro laboratorio han mostrado que la IF_1 estabiliza o induce la formación del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa. Esto indica que IF_1 podría estabilizar la estructura dimérica de la ATP sintasa al formar parte del puente F_1 - F_1 de este dímero. Esto concuerda con resultados previos de desnaturalización por presión en donde se ha observado que la IF_1 estabiliza a la enzima [24].

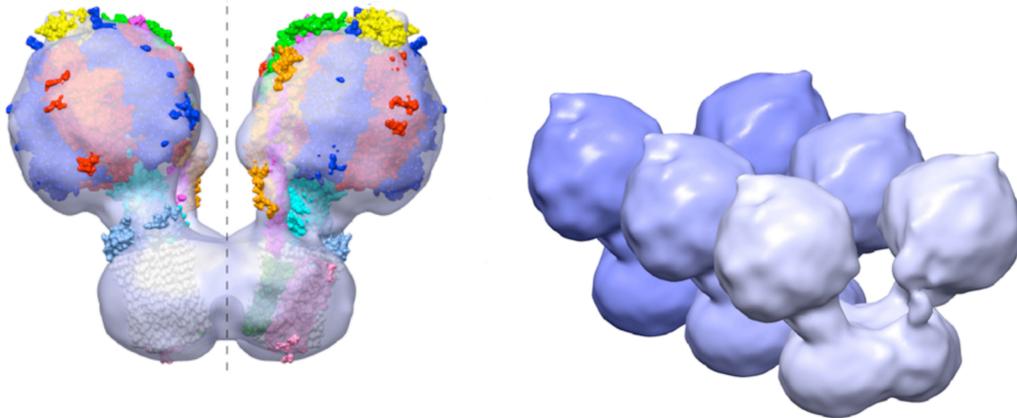


Figura 5. Estructura 3D del dímero de la ATP sintasa mitocondrial y modelo en 3D del oligómero de la ATP sintasa que forma las crestas mitocondriales. Del lado izquierdo se muestra la estructura obtenida por reconstrucción en 3D del dímero de la ATP sintasa de levadura (superficie color gris claro semi-transparente). La estructura tiene un ángulo similar ($\approx 45^\circ$) a la obtenida en 2D para el dímero de la enzima de corazón de bovino (Fig. 4), y muestra la posición abierta de los dos cuellos laterales en la interfase del dímero. La estructura tiene una simetría dual (eje de simetría central en línea discontinua) y acomoda muy bien a la estructura atómica de la ATP sintasa de levadura incluyendo a la mayoría de las subunidades de la ATP sintasa incluyendo las de F_1 , F_0 , y las de los cuellos laterales. Del lado derecho se muestra el primer modelo en 3D del oligómero de la ATP sintasa que forma las crestas mitocondriales, el cual se propone se forma por interacciones de los cuellos laterales en las interfases dímero-dímero, y los canales de protones. La estructura debe ser flexible y abrirse o cerrarse de forma similar a un acordeón en las interfases dímero-dímero para darle la curvatura a las crestas mitocondriales. Modificado de Couoh-Cardel y cols., 2010 [25].

Recientemente, en colaboración con el Dr. Stephan Wilkens, ahora en la SUNY Upstate Medical School de NY, USA, hemos logrado obtener la estructura en 3D del dímero de la ATP sintasa mitocondrial aislada a partir de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La ventaja de esta preparación es que contiene una mayor proporción de dímero respecto al monómero al compararla con la preparación que obtuvimos previamente de corazón de bovino [21] (Fig. 4). Otros grupos habían logrado posteriormente obtener al dímero de levadura o de algunas especies de algas y aunque han encontrado estructuras similares y distintas a las que hemos encontrado en nuestro laboratorio, no habían obtenido un modelo en 3D de la estructura dimérica, la cual es esencial para comprender estructuralmente cómo se forman las crestas mitocondriales en tres dimensiones, así como resolver la posición de las subunidades dimerizantes en la interfase del dímero. Con la preparación dimérica que obtuvimos de levadura, se capturaron alrededor de 10,000 imágenes individuales del dímero, las cuales se depositaron en varias orientaciones en las rejillas del microscopio electrónico, de tal manera que pudimos obtener por alineamientos, promedios y reconstrucción en 3D de las imágenes la estructura completa del dímero de la ATP sintasa [25]. Simultáneamente pudimos construir un modelo atómico del dímero conteniendo la mayoría de las estructuras atómicas de las subunidades de la F_1 y del canal F_0 , así como del cuello periférico (Fig. 5). El modelo 3D resultó muy robusto y

acomodó muy bien a todas las estructuras atómicas tanto de F_1 como de F_0 y del cuello periférico, confirmándose que el ángulo mayoritario entre los ejes mayores de cada monómero es aproximadamente de 45° , similar al que observamos en el dímero de bovino [21] (Figs. 4 y 5). Esta estructura dimérica es entonces la más estable termodinámicamente al ser aislada de la mitocondria y contrario a las sugerencias de otros grupos [26-28], es muy probable que represente la base estructural que le da su forma a las crestas mitocondriales. Rasgos importantes de la estructura en 3D del dímero son principalmente, el eje central de simetría dual que atraviesa la interfase del dímero (Fig. 5), y que los cuellos laterales no forman contactos entre sí en esta interfase dimerizante, sino que se abren hacia la superficie externa del dímero muy probablemente para formar otra interfase oligomerizante que finalmente le dará forma a las crestas mitocondriales (Fig. 5). Así mismo, observamos la posición de algunas subunidades del canal de protones como son los anillos del decámero de subunidades c (c_{10}) y la subunidad a , que forman la interfase transportadora de protones para la síntesis del ATP. Otros detalles importantes se describen en la publicación respectiva (Couch-Cardel y cols., 2010, [25]) pero cabe señalar que nuestra estructura descarta otros modelos lineales del oligómero de la ATP sintasa mitocondrial, y forma la base para el primer modelo en 3D del dímero y el oligómero de la enzima que forma las crestas mitocondriales.

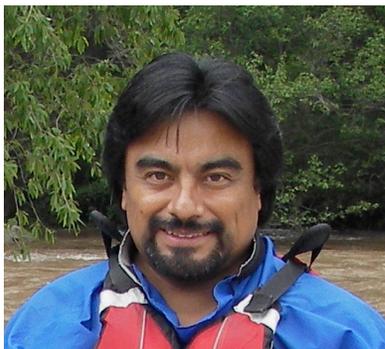
En conclusión de estos últimos resultados, nuestra estructura dimérica de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial abre una nueva faceta en el estudio de la geometría de las subunidades de la enzima en el dímero, y cómo se estructuran los dímeros para producir los polímeros que dan forma a las crestas mitocondriales. La F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial no sólo funciona como el motor molecular más eficiente que sintetiza al ATP, sino que al dimerizarse y polimerizarse aumenta la superficie membranal disponible para la fosforilación oxidativa. Así mismo, la futura resolución del arreglo de los demás super-complejos respiratorios y otras proteínas esenciales para la formación de las crestas mitocondriales nos darán una nueva visión de la estructura mitocondrial y los microdominios que gobiernan el acoplamiento quimiosmótico global o localizado que ocurre en las mitocondrias.

Referencias

1. Noji, H. y Yoshida, M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 1665-1668
2. Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G. y Walker, J. E. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16823-16827
3. Boyer, P. D. (1997) *Annu Rev Biochem* **66**, 717-749
4. García, J. J. (2000) *The F_0F_1 -ATP synthase: binding energy, coupling and rotational catalysis*, First ed., Transworld Research Network, Trivandrum
5. García, J. J., Minauro-Sanmiguel, F. y Bravo, C. (ed) (2002) *Mitochondrial ATP synthase: Structure, function, assembly, and a topography model for human subunit 6*, Vol. I, Research Signpost, Trivandrum
6. John, P. y Whatley, F. R. (1975) *Nature* **254**, 495-498
7. Gray, M. W., Burger, G. y Lang, B. F. (1999) *Science* **283**, 1476-1481
8. Perez, J. A. y Ferguson, S. J. (1990) *Biochemistry* **29**, 10503-10518
9. Zharova, T. V. y Vinogradov, A. D. (2003) *Biochemistry (Mosc)* **68**, 1101-1108
10. Morales-Rios, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernandez, G., Rodriguez-Zavala, J. S., Celis, H., Zarco-Zavala, M. y Garcia-Trejo, J. J. (2010) *FASEB J* **24**, 599-608
11. Jackson, P. J. y Harris, D. A. (1988) *FEBS Lett* **229**, 224-228
12. Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C. y Garcia, J. J. (2002) *J Bioenerg Biomembr* **34**, 433-443
13. Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. y Walker, J. E. (2003) *Nat Struct Biol* **10**, 744-750
14. Cabezón, E., Butler, P. J., Runswick, M. J. y Walker, J. E. (2000) *J Biol Chem* **275**, 25460-25464
15. Schagger, H. (2001) *IUBMB Life* **52**, 119-128

16. Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. y Schagger, H. (1998) *Embo J* **17**, 7170-7178
17. Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M. F., Dautant, A., Brethes, D. y Velours, J. (2004) *J Biol Chem* **279**, 40392-40399
18. Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P. y Velours, J. (2002) *Embo J* **21**, 221-230
19. Gavin, P. D., Prescott, M., Luff, S. E. y Devenish, R. J. (2004) *J Cell Sci* **117**, 2333-2343
20. Allen, R. D. (1995) *Protoplasma* **189**, 1-8
21. Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S. y Garcia, J. J. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12356-12358
22. Garcia, J. J., Morales-Rios, E., Cortes-Hernández, P. y Rodríguez-Zavala, J. S. (2006) *Biochemistry* **45**, 12695-12703
23. Bravo, C., Minauro-Sanmiguel, F., Morales-Rios, E., Rodríguez-Zavala, J. S. y Garcia, J. J. (2004) *J Bioenerg Biomembr* **36**, 257-264
24. Fornells, L. A., Guimaraes-Motta, H., Nehme, J. S., Martins, O. B. y Silva, J. L. (1998) *Arch Biochem Biophys* **349**, 304-312
25. Couoh-Cardel, S. J., Uribe-Carvajal, S., Wilkens, S. y García-Trejo, J. J. (2010) *J Biol Chem* **285**, 36447-36455
26. Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E. J. y Braun, H. P. (2005) *FEBS Lett* **579**, 5769-5772
27. Dudkina, N. V., Oostergetel, G. T., Lewejohann, D., Braun, H. P. y Boekema, E. J. *Biochim Biophys Acta* **1797**, 272-277
28. Thomas, D., Bron, P., Weimann, T., Dautant, A., Giraud, M. F., Paumard, P., Salin, B., Cavalier, A., Velours, J. y Brethes, D. (2008) *Biol Cell* **100**, 591-601

Semblanza del Dr. José de Jesús García Trejo



El Dr. José de Jesús García Trejo estudió licenciatura, maestría y doctorado en Investigación Biomédica Básica de la UNAM, galardonado con la Medalla Gabino Barreda. El campo de estudio del Dr. García Trejo se enfoca en el nano-motor más importante de todas las formas de vida: la F_1F_0 -ATP sintasa. Este es el nanomotor ubicuo que genera la energía química necesaria para todas las células al sintetizar al ATP, el cual se hidroliza en ADP y fosfato inorgánico (Pi) para impulsar todas las funciones y formas de trabajo celular más vitales, incluyendo la síntesis de macromoléculas (ADN, proteínas, etc.), las diversas formas de movimiento y trabajo mecánico celular, así como el trabajo osmótico y de transporte

de nutrientes, iones, etc. Esta línea se derivó de sus estudios de posgrado en los laboratorios de los Dres. Marietta Tuena de Sangri y Armando Gómez-Puyou, ambos investigadores eméritos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El Dr. García Trejo culminó su formación postdoctoral en bioquímica y biología molecular en el laboratorio del Dr. Roderick A. Capaldi, en la Universidad de Oregon, USA, y posteriormente fue repatriado por el CONACYT al Instituto Nacional de Cardiología de México, donde consolidó su trayectoria por 10 años para después re-instalar su actual laboratorio en la Facultad de Química de la UNAM. El Dr. García Trejo es Investigador Nivel-II del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) del CONACYT; ha publicado más de 30 artículos internacionales en las mejores revistas y libros de Bioquímica y Biología Molecular en USA y Europa, además de haber editado un libro internacional, y ser árbitro revisor de 5 de estas mismas revistas internacionales. Esto además de dirigir varias tesis de licenciatura, maestría y doctorado de actuales investigadores en bioquímica a nivel nacional e internacional. Las aportaciones más importantes del Dr. García Trejo en el campo de la bioenergética y la estructura, regulación y evolución de la ATP sintasa son las siguientes: la cinética y energética de la fosforilación oxidativa y del mecanismo rotacional del nanomotor F_1 -ATPasa; la estructura tridimensional y biogénesis de las mitocondrias al resolver la estructura dimérica en 2D y 3D de la ATP sintasa mitocondrial que le da forma a las crestas mitocondriales; más recientemente en la bioenergética, evolución y microbiología bacteriana al descubrir una novedosa proteína inhibidora o subunidad ζ de la ATP sintasa en las α -proteobacterias. Estas dos últimas líneas lo mantienen en la frontera de su campo y le abrieron importantes colaboraciones internacionales con el Dr. Stephan Wilkens de la SUNY Upstate Medical School de NY, USA, y de manera sobresaliente con dos Premios Nobel de Química, con el Dr. Sir John E. Walker, de Cambridge, UK, y el Dr. Kurt Wüthrich del Scripps Research Institute, de California, USA; esto para descifrar a nivel atómico el nuevo mecanismo de regulación del nanomotor ATP sintasa por la subunidad ζ en las α -proteobacterias. En el ámbito de investigación clínica, el impacto de sus publicaciones abarca la proteómica y genómica de las miopatías mitocondriales y cardiomiopatías humanas, el control de la angiogénesis y el transporte de colesterol. Además de todo esto, el Dr. García Trejo ha mantenido una labor docente continua a nivel licenciatura y posgrado impartiendo cursos de Fisiología Microbiana, Bioquímica y Termodinámica de Proteínas, respectivamente, esto desde sus inicios como estudiante de posgrado de la UNAM hasta la fecha como Profesor Titular del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 53-66. 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 PAISAJE CONFORMACIONAL DE UN DOMINIO DE INMUNOGLOBULINA EXPLORADO CON DINÁMICA MOLECULAR

CONFORMATIONAL LANDSCAPE OF AN IMMUNOGLOBULIN DOMAIN EXPLORED BY MOLECULAR DYNAMICS

Nina Pastor Colón¹ y D. Alejandro Fernández Velasco²

¹Facultad de Ciencias, UAEM, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos; ²Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Facultad de Medicina, UNAM, Cd. Universitaria, 04510 México D.F.

nina@uaem.mx, fdaniel@servidor.unam.mx

Resumen

El paisaje conformacional de una proteína describe todas sus estructuras posibles. En general, el estado de mínima energía libre corresponde al estado nativo. Sin embargo, bajo condiciones desestabilizantes es posible que se formen agregados ordenados (fibras amiloides) o desordenados, dando lugar a enfermedades de plegamiento como la amiloidosis de cadena ligera. En esta enfermedad, un exceso de dominios variables de cadena ligera de inmunoglobulina se agrega en múltiples órganos. Buscando el mecanismo que rige la conversión de la forma globular soluble a la conformación amiloide de dominio, realizamos simulaciones por dinámica molecular de una colección de variantes con diversas estabilidades y facilidades para formar fibras. Partiendo de la estructura cristalográfica de un monómero, perturbamos al estado nativo mediante mutación y temperatura. Exploramos el paisaje conformacional para determinar la existencia y propiedades de intermediarios que pudieran promover la formación de fibras.

Palabras clave: Plegamiento, intermediarios, amiloides, simulaciones.

Abstract

The conformational landscape of a protein describes all its possible structures. In general, the native state corresponds to the state with the lowest overall free energy. Nonetheless, under destabilizing conditions the protein can form ordered (amyloid) or disordered

aggregates, leading to misfolding diseases such as light chain amyloidosis. In this particular case, an excess of light chain immunoglobulin domains aggregates in multiple organs. Searching for the mechanism that underlies the conversion from a soluble globular conformation to amyloid fibers for these domains, we carry out molecular dynamics simulations of a collection of variants with diverse stabilities and ease of fiber formation. Starting from the crystallographic structure of monomers, we perturb the native state via mutations and temperature. We explore the conformational landscape in order to determine the existence and properties of folding intermediates that may promote fiber formation.

Keywords: Folding, intermediates, amyloid, simulations.

Introducción

El proceso de plegamiento de las proteínas es un tema fascinante por muchas razones. Desde el punto de vista biológico, permite la transformación de un código unidimensional (la secuencia de aminoácidos) en estructuras tridimensionales con función biológica, sujeta a presión evolutiva y por lo tanto a selección. Desde el punto de vista químico, las proteínas son polímeros lineales atácticos (es decir, con sustituyentes distribuidos de manera aleatoria a lo largo de la cadena), con veinte cadenas laterales diferentes en cuanto a tamaño, polaridad y carga. Cuando este polímero es inmerso en un solvente con el cual no es del todo compatible, como el agua, ocurre una segregación de cadenas laterales: las que sí son compatibles con el solvente quedan expuestas, y las demás se esconden en el interior de un glóbulo compacto, dando lugar al estado nativo. Por supuesto, si se cambia el solvente, modificando la temperatura, o la concentración de solutos, entonces la segregación de cadenas laterales resultará en otra estructura o estructuras, las cuales podrán variar desde glóbulos parcialmente compactos, hasta estados hidratados y poco compactos en el estado desnaturalizado. Desde el punto de vista físico, el plegamiento es una transición entre el desorden del ensamble desnaturalizado al orden del estado nativo; mientras la cadena polipeptídica se ordena, ganando interacciones intramoleculares, el solvente se desordena, pagando de sobra el costo entrópico. Hay una compensación casi completa de la ganancia entálpica intramolecular con la pérdida entrópica de la cadena y la ganancia entrópica del solvente, de tal manera que la barrera energética para el plegamiento no es muy grande, y el proceso puede darse en escalas de tiempo biológicamente relevantes [1]. Además, gracias a los experimentos de Anfinsen en los años 70 del siglo pasado, sabemos que el estado nativo corresponde en general al mínimo termodinámico de la superficie de energía libre que describe el paisaje conformacional de la proteína [2].

En el caso más sencillo, el plegamiento de proteínas se modela como un proceso de dos estados: el nativo y el desnaturalizado. En este tipo de modelo, el más sencillo de todos, se asume que conforme uno avanza a lo largo de una coordenada de reacción, lo único que ocurre es que cambian las poblaciones relativas de estos dos estados. Si bien este es un modelo útil, es obvio que a nivel molecular existen todos los intermediarios conformacionales necesarios para conectar de manera suave a los estados inicial y final del proceso (el nativo y el desnaturalizado). El detalle importante es que la población de cada uno de estos intermediarios depende de la energía libre relativa al estado más estable, vía la ecuación de Boltzmann. Mientras menos estable sea el estado, menos poblado estará. El esquema de dos estados es bueno para reproducir datos experimentales ya que los intermediarios son de mayor energía que los estados basales en sus respectivas condiciones, esto es, el estado nativo es el más estable en condiciones "fisiológicas" y el estado desnaturalizado en condiciones extremas de temperatura, pH o en presencia de solventes caotrópicos.

Para entender como ocurre el proceso de plegamiento a nivel molecular se necesitan métodos experimentales que puedan caracterizar la estructura y dinámica de todos los estados intermedios del proceso. Esto se ha empezado a hacer con resonancia magnética nuclear, pero solo se pueden estudiar estados conformacionalmente compactos, cercanos al estado nativo [3]. Comenzando desde el ensamble desnaturalizado, los estudios de correlación de fluorescencia han dado información interesante sobre los primeros contactos que se hacen en una cadena desordenada [4]. En los últimos años se han desarrollado un gran número de metodologías que permiten escudriñar con detalle los pormenores dinámicos de las proteínas [5], sin embargo, algunas de las metodologías más poderosas para estudiar el estado de transición, como la ingeniería de proteínas, fueron desarrolladas hace casi 30 años [6]. En este enfoque, también llamado análisis de valores phi, se hacen mutaciones puntuales que eliminan grupos metilo de las cadenas laterales, y se evalúa el efecto de estas mutaciones sobre la estabilidad del estado nativo y sobre la cinética de plegamiento. Todos estos métodos son relativamente indirectos, y requieren de modelos cinéticos y termodinámicos para su interpretación, porque no hay un microscopio que tenga resolución molecular. Aquí es donde las simulaciones por dinámica molecular se convierten en una herramienta cada vez más utilizada en el estudio del plegamiento de proteínas, no sólo para explicar los datos experimentales generados por los enfoques ya descritos, sino como una fuente de predicciones para futuros experimentos.

¿Por qué nos interesa tanto saber como se pliegan las proteínas? Desde hace un par de décadas hemos caído en la cuenta de que prácticamente todas las proteínas pueden adquirir una conformación no nativa llamada fibra amiloide [7], la cual esta formada principalmente por hebras beta apiladas una sobre otra, formando un sandwich muy delgado (de unos ocho aminoácidos de grosor) y muy largo (micras de longitud, sin ramificaciones). Al parecer, estas fibras son más estables que el estado nativo funcional, y representan un estado primitivo de las proteínas [8]. Recientemente se han descrito fibras amiloides funcionales en bacterias, hongos, insectos, invertebrados y mamíferos cuya función es estructural, regulatoria, de almacenamiento o como portadoras de información [9]. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la presencia de fibras está relacionada con las llamadas “enfermedades de plegamiento”, una muy diversa lista de patologías que incluye a la diabetes tipo II, la formación de cataratas y un gran número patologías del sistema nervioso central, como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y la de las vacas locas [8]. La formación de fibras representa un problema por dos razones: por un lado, implica una pérdida de función, ya que al no estar en su conformación nativa, la proteína no puede llevar a cabo su tarea particular; por otro lado, en el proceso de formación de fibras se generan oligómeros que parecen ser tóxicos para la célula [10]. Las enfermedades de plegamiento aparecen típicamente en individuos viejos, en los cuales todas las enzimas encargadas del control de calidad del plegamiento empiezan a fallar, y la población mundial envejece globalmente a grandes pasos. Por lo tanto, estas enfermedades aumentan en prevalencia, sin que a la fecha exista un tratamiento eficaz para detenerlas. Un primer paso en esta dirección es entender qué puede pasarle a una cadena polipeptídica mientras navega por su paisaje conformacional.

A nosotros nos interesa una enfermedad de plegamiento llamada amiloidosis de cadena ligera o AL. En este caso en particular, una clona de células B produce un exceso de cadena ligera de anticuerpos maduros [11]. Normalmente, estas células son las encargadas de producir anticuerpos, los cuales están formados por dos cadenas pesadas idénticas, y dos cadenas ligeras también idénticas. Tenemos cinco tipos de cadena pesada (mu, delta, gamma, alfa y epsilon) y dos de cadena ligera (kappa y lambda). Los anticuerpos tienen dos tipos básicos de dominios: los constantes y los variables. Ambos son sandwiches beta, y la diferencia entre ellos es el número de hebras que componen a cada cara del sandwich (3 + 4 para los constantes, 5 + 4 para los variables). Un dominio variable de una cadena pesada y uno de una ligera forman un sitio de unión para antígeno; los sitios de unión presentan las regiones más variables en la secuencia del anticuerpo. De hecho, estos dominios variables se construyen mediante recombinación combinatoria de fragmentos V y J para la cadena ligera, y V, D y J para la cadena

pesada, seguido de un proceso de hipermutación somática. El resultado de este proceso es que ante un mismo reto inmunológico, cada individuo produce un conjunto diferente de anticuerpos para contender con él [12]. En la sangre de un individuo sano se encuentran más cadenas kappa que lambda, y éstas siempre están asociadas a cadenas pesadas, formando parte de anticuerpos funcionales. En los pacientes con AL son más comunes las cadenas lambda (en particular, de las familias 6a y 3r [13]); la cadena ligera se expresa sola, y en gran cantidad, depositándose en forma de fibras amiloides de forma sistémica, es decir, en todo el cuerpo. Es una enfermedad letal, ya que tiende a depositar fibras principalmente en el corazón y en los riñones [14]. Las fibras suelen contener el dominio variable de la cadena ligera, la cual ya vimos que es hipervariable en secuencia. Esto quiere decir que cada paciente tiene una proteína diferente en las fibras, lo cual complica notablemente el análisis de la etiología de la enfermedad [11].

La incidencia de AL es baja, lo cual indica que no todas las cadenas ligeras tienen la combinación de mutaciones perdedora. Cada mutación puede tener al menos dos efectos: aumentar la propensión para formar fibras del segmento en el que se encuentra, y/o desestabilizar al estado nativo, permitiendo que la proteína pueble eficientemente intermediarios de plegamiento que sean proclives a asociarse entre sí. A este respecto, los Richardson describieron una serie de mecanismos de seguridad que tienen los dominios de inmunoglobulina para evitar agregarse [15], ya que se trata de proteínas compuestas casi exclusivamente por hebras beta, y por lo tanto, su conversión a una fibra amiloide se antoja sencilla. Básicamente los mecanismos de seguridad implican el bloqueo de los bordes del sandwich, mediante la colocación estratégica de prolinas, y con un lazo que conecta a las hebras C y D. Respecto a la propensión para formar fibras, se han propuesto varios algoritmos para predecir a partir de la estructura primaria de las proteínas si estas formarían fibras o no. Hace aproximadamente un año, el grupo de Eisenberg publicó un algoritmo llamado ZipperDB, el cual toma segmentos de seis aminoácidos y los modela como una sección de fibra amiloide de cinco monómeros. Para esta estructura evalúa la energía de todos los segmentos de seis aminoácidos posibles para una proteína, y regresa un perfil de propensión de formación de fibras [16]. Curiosamente, encontraron que en cada una de las proteínas codificadas por el genoma humano hay al menos una zona con alto potencial para formar fibras, a pesar de esto, no todas las proteínas forman fibras, ya que en general las interacciones propias del estado nativo no le dan libertad conformacional a ese segmento. Con este programa analizamos un conjunto de ~30 secuencias de cadenas lambda VI de pacientes con AL, y los comparamos con secuencias de individuos sanos o con mieloma múltiple (en esta condición también se produce una gran cantidad de proteína, pero no se forman fibras), reportadas en [17]. Comparando los perfiles de formación de fibras de estos dos grupos, encontramos tres zonas de la proteína que son consistentemente pro-formadoras de fibras en los pacientes, y no en individuos sin AL (Figura 1).

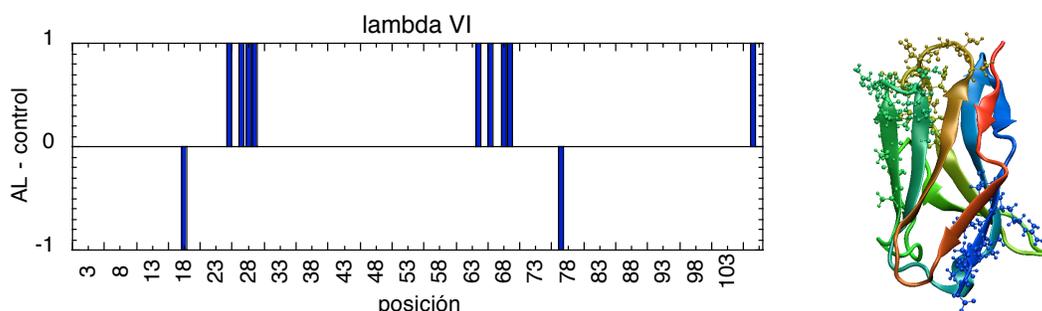


Figura 1. Zonas estéricamente compatibles con la formación de fibras en proteínas derivada de pacientes (cuadro superior) y en individuos sanos (cuadro inferior). A la derecha se muestran, sobre la estructura de 2W0K, las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la formación de fibras en pacientes.

Estas zonas corresponden al CDR1; la hebra D; el amino terminal de la hebra E y el carboxilo terminal de la hebra G. La hebra D está protegida por el asa C'-C", y la hebra G está asociada con la hebra A; estas dos interacciones forman parte de los de los mecanismos antiagregación de los dominios de inmunoglobulina. Por lo tanto, podemos suponer que mutaciones que desestabilicen estas zonas estarán involucradas en la formación de fibras amiloides: "se estarían juntando las ganas de hacer fibras con la disponibilidad de esa región".

¿Cómo saber si este escenario es posible? Escogimos un grupo de proteínas pertenecientes al grupo lambda VI, por su prevalencia en la clínica, y porque contamos con información estructural, de la termodinámica y cinética de plegamiento, y de la cinética de formación de fibras amiloides *in vitro* [18-22]. En el grupo se encuentran JTO y WIL, dos proteínas derivadas de pacientes con mieloma múltiple sin AL, y con AL, respectivamente. Como modelos de las propiedades de línea germinal, tenemos a R24 y G24, los dos alotipos más frecuentes en la población (75% y 24%, respectivamente), que sólo difieren en una posición en la secuencia pero tienen propiedades termodinámicas y de formación de fibras muy diferentes:

Tabla I. Estabilidad y fibrilogénesis de proteínas λ_6 .

	ΔG_{H_2O} (kcal/mol) ^a	t_{lag} (h)
R24	5.2 ± 0.2	14.0 ± 0.5
JTO	4.3 ± 1.0	5.5 ± 0.3
G24	3.7 ± 0.2	2.0 ± 0.3
WIL	2.2 ± 0.9	3.4 ± 1.0

^aEl ΔG_{H_2O} corresponde a la diferencia de energía entre el estado nativo y el desnaturalizado, y el t_{lag} al tiempo de retardo en la cinética de formación de fibras.

De esta tabla puede observarse que parece haber una correlación, al aumentar la estabilidad termodinámica de la proteína es más difícil que forme fibras. La idea básica es que el estado nativo debe ser perturbado para permitir la formación de los contactos intermoleculares que producen fibras. Esta puede ser una perturbación local, en la que solamente se desnaturaliza una sección de la proteína, o algo más drástico que la lleve al ensamble desnaturalizado [23]. Lo notable es que no se conoce la estructura de ninguno de estos precursores, en buena medida debido a que son especies con una energía libre mayor que el estado nativo y por lo tanto, poco pobladas. Nuestro trabajo es justamente proponer como son estos intermediarios, y para esto, usamos simulaciones por dinámica molecular.

Dinámica molecular

La dinámica molecular es una técnica de mecánica estadística, que conecta el comportamiento de un grupo pequeño de partículas (decenas de miles) con el mundo macroscópico (con un número de Avogadro de partículas). En una simulación clásica, lo que suponemos es que los átomos son esferas blandas con carga, unidas entre si por resortes armónicos que representan los enlaces [24]. Las interacciones entre estos átomos están descritas por funciones con derivadas analíticas, de manera que se puedan calcular rápida y eficientemente las fuerzas que operan entre cada pareja de átomos en el sistema. Estas funciones son llamadas campos de fuerza, y los más comunes para la simulación de proteínas son CHARMM, AMBER y GROMOS [25-27]. Partiendo de un conjunto de coordenadas para

cada uno de los átomos que se van a simular (en este caso, la proteína rodeada de moléculas de agua y iones de potasio y cloro en una concentración 0.1 M), una simulación transcurre de esta manera: me ubico en el primer átomo, y calculo la suma vectorial de las fuerzas con las que el resto de los átomos lo jalan o repelen. Con esa fuerza resultante calculo la aceleración que le imprime al átomo, usando la segunda ley de Newton: $F = ma$, donde m es la masa del átomo. Ahora, uso esa aceleración para cambiar la cantidad y dirección de movimiento que tenía el átomo, usando una versión computacionalmente eficiente de una ecuación de cinemática que aprendimos en la secundaria: $\mathbf{x} = \mathbf{x}_0 + \mathbf{v}_0t + (\mathbf{a}t^2)/2$. Lo único que no hemos definido hasta ahora es de dónde salen las velocidades iniciales. De acuerdo a la ecuación de Maxwell-Boltzmann, sabemos que hay una relación directa entre la velocidad a la que se mueven las partículas (más estrictamente hablando, su momento, que no es otra cosa que su velocidad multiplicada por su masa) y la temperatura del sistema. Cuando decidimos a que temperatura queremos hacer la simulación, lo que hacemos es asignar aleatoriamente un conjunto de velocidades de acuerdo a la distribución de Maxwell-Boltzmann para esa temperatura. Ahora sí, lo único que resta es repetir este procedimiento de calcular fuerzas para obtener aceleraciones y modificar así la posición de los átomos, un pasito a la vez. Ese paso es en realidad pequeño, del orden de femtosegundos. ¿Por qué? La segunda ley de Newton supone que la fuerza es constante, y esto sólo es cierto para intervalos de tiempo muy cortos si el átomo que se está moviendo está inmerso en un medio condensado, densamente empacado: pequeños desplazamientos del átomo pueden cambiar drásticamente su entorno, y por lo tanto, las fuerzas que actúan sobre él. Por lo tanto, una simulación requiere miles de millones de pasos, de manera que uno pueda llegar a tiempos biológicamente razonables. En el caso particular del plegamiento de proteínas, el record de velocidad lo tienen proteínas muy pequeñas, del orden de 40 aminoácidos, que son capaces de plegarse en poco menos de un microsegundo [28]. Para poder simular esto, necesitamos hacer 1×10^9 pasos al menos.

¿Qué tanto nos podemos creer de lo que se obtiene de una simulación? Lo que muestran varias revisiones recientes es que cada vez son más fidedignas, gracias a avances tanto en el software (programas de uso general como NAMD [29] y GROMACS [30], o algunos hechos en casa), el hardware (que permite simular tiempos más largos, usando trucos muy interesantes como el cómputo distribuido) y en la descripción de las interacciones entre los átomos [31]. Por supuesto, son modelos, y como tales, siempre habrán detalles que no incluyen. Lo que hemos platicado hasta ahora no permite tratar reacciones químicas, proceso para el cual la descripción de átomos como esferas blandas con carga es claramente insuficiente. Sin embargo, para describir procesos en los cuales no cambia ni la cantidad ni la calidad de los enlaces entre los átomos, es adecuada y suficiente. Véase por ejemplo el caso de Anton, una supercomputadora dedicada exclusivamente a estudiar plegamiento, y su éxito reciente describiendo no solo el plegamiento sino también la variedad estructural del estado nativo de proteínas pequeñas [32].

Dinámica molecular de dominios de inmunoglobulina

Hacemos dos tipos de simulaciones. Para estudiar qué tan rugoso es el mínimo de la superficie de energía libre que corresponde al estado nativo, simulamos a los cuatro dominios (JTO, WIL, R24 y G24) en condiciones que favorecen al estado nativo (298K). Estas son simulaciones de un estado de equilibrio, y eso nos permite decir que lo que vemos en escalas de tiempo de decenas de nanosegundos será comparable con medidas macroscópicas que se hacen en tiempos de minutos u horas. Recordemos que la definición de un sistema en equilibrio implica que aquello que estamos midiendo no cambia con el tiempo.

Nos encantaría poder estudiar el plegamiento de estos dominios de Ig con dinámica molecular, pero son demasiado grandes incluso para Anton [32], o para el cómputo distribuido de Vijay Pande [33]. En lugar de esto, vamos a usar el principio de reversibilidad microscópica, y a suponer que las rutas de desplegamiento de la proteína son las mismas que las de plegamiento,

pero vistas en reversa [34]. Vamos a tomar al estado nativo que conocemos, y lo vamos a perturbar aumentando la temperatura, para hacer más eficiente el salto de las barreras de activación que lo separan del ensamble de intermediarios de plegamiento y el desnaturalizado. Las temperaturas que usamos no son fisiológicas (398 y 498K), y su única intención es acelerar el proceso. Hay otras técnicas posibles para hacer esto, como la metadinámica [35], la dinámica acelerada [36] y el intercambio de réplicas [37] por ejemplo, pero el grupo de Valerie Daggett ha mostrado que este es un método eficiente y que da resultados comparables con los experimentos [38]. Este tipo de simulaciones no es de estados de equilibrio, sino de procesos, y por lo tanto, se necesita hacer varias réplicas de la simulación. ¿Cuántas son suficientes? Usando cómputo distribuido [33] se pueden correr decenas de miles de simulaciones, y luego juntar toda esta información para reconstruir tanto la termodinámica como la cinética del proceso, pero esto está fuera de nuestro alcance, tanto técnicamente como por el tamaño de las proteínas que nos interesan. Afortunadamente, Daggett *et al.* mostraron que se puede obtener información razonablemente precisa con diez réplicas, comparándolas con la obtenida de cien [39]. Cada réplica comienza con las mismas coordenadas iniciales, y difiere solamente en las velocidades asignadas. Esto es suficiente para mandar al sistema en direcciones diferentes en la superficie de energía libre y hacer un muestreo más eficiente de posibles rutas.

¿Qué tan largas deben ser las simulaciones? En el caso de simulaciones de equilibrio, el estándar actual va entre las decenas de nanosegundos hasta los microsegundos. Mientras más largas sean, mas oportunidad habrá de ver eventos poco probables (pero no por ello menos importantes). Nosotros hacemos cinco réplicas de 50 ns cada una, para un tiempo total de muestreo de 250 ns. Para las simulaciones fuera del equilibrio, uno debe al menos simular el tiempo suficiente para que ocurra el proceso que se quiere ver. Encontramos que podemos desnaturalizar a la proteína por completo a 498K con 100 ns, y hacemos diez réplicas de esa duración. Las simulaciones a 398K también son de 100 ns, pero en este caso no logramos desnaturalizar por completo a la proteína. En este caso, consideramos que seguimos muestreando lo que ocurre en la cuenca nativa de la proteína.

Topografía de la cuenca nativa

Supongamos lo siguiente: las proteínas más estables son aquellas que están mínimamente frustradas, es decir, aquellas que en su estado nativo presentan interacciones que son todas congruentes entre sí [40]. En este caso, la proteína fluctúa de forma armónica alrededor de un solo mínimo de energía libre, y por lo tanto, su cuenca nativa es lisa. Si por el contrario la proteína tiene interacciones no perfectamente compatibles entre sí, entonces oscilará entre las soluciones subóptimas que encuentre. Cada una de estas soluciones subóptimas será una conformación ligeramente diferente, manteniendo la topología del estado nativo, y corresponderá a un mínimo local dentro de la cuenca nativa, la cual es rugosa. Lo interesante en este caso es que quizás uno de estos estados puede ser competente para formar fibras.

La hipótesis de trabajo entonces, es que mientras menos estable es la proteína, más rugosa será su cuenca nativa. Para ver si esto es cierto, tomamos las estructuras generadas durante 250 ns de simulación para cada una de las proteínas, y preguntamos qué tan similares son en estructura entre sí, con un corte en 2 Ångstroms como límite superior de diferencia: dos estructuras pertenecen a un mismo grupo si su diferencia estructural es inferior a este corte. Encontramos que R24 (el dominio más estable) se puede describir con un solo grupo, es decir, su cuenca nativa es lisa. En contraste, G24 presenta tres mínimos, lo cual va bien con la hipótesis planteada. JTO también presenta tres mínimos, pero WIL sólo tiene un grupo, a pesar de ser la menos estable de las cuatro (Figura 2).



Figura 2. Superposición de las estructuras nativas encontradas en las simulaciones a temperatura ambiente para cada una de las proteínas.

Esto nos indica que la rugosidad de la cuenca nativa no está relacionada ni con la estabilidad de la proteína ni con su propensión para formar fibras, o que nuestras simulaciones no son suficientemente largas. Para ver si estamos hablando de un problema de muestreo, hicimos las simulaciones a 398K y repetimos el análisis. En este caso, logramos una desnaturalización parcial de todas las proteínas.

Caracterizar estructuralmente estados nativos es relativamente fácil, ya que se limitan a oscilar alrededor de una estructura estable. La descripción de estructuras lábiles es mucho mas complicada. Una medida comúnmente utilizada es la pérdida de contactos nativos entre carbonos alfa. En nuestro caso, definimos un contacto nativo como un par de carbonos alfa que estuvieron a una distancia menor o igual a 6 Ångstroms, al menos durante la mitad del tiempo de simulación a 298K. Con esta lista de contactos, preguntamos en las simulaciones a 398K cuántos se habían perdido, y los marcamos sobre las estructuras de las proteínas (Figura 3).

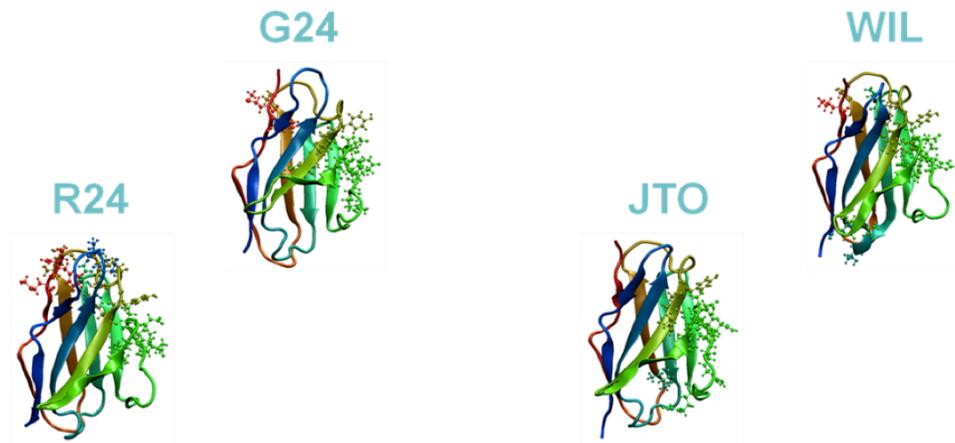


Figura 3. Cadenas laterales de los residuos que pierden interacciones al elevar de 298K a 398K la temperatura de simulación.

Vemos que aunque cada proteína pierde un grupo diferente de contactos, tienen cosas en común: todas debilitan los contactos entre el asa C'-C" (mostrada en verde a la derecha de cada una) con el resto de la proteína, y todas menos JTO debilitan el contacto entre el amino terminal y las hebras adyacentes. Recordemos que estas dos zonas son parte de los mecanismos de protección contra la agregación.

Un ejemplo de los grupos poblados a 398K para WIL se muestra en la Figura 4.

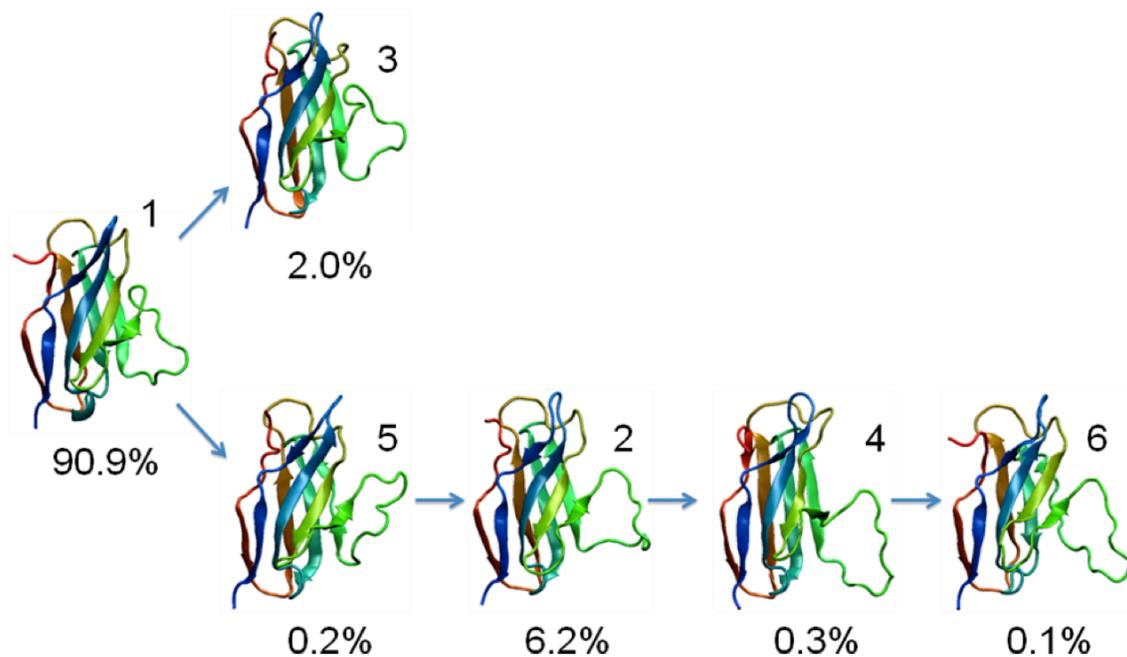


Figura 4. Estructuras pobladas por WIL a 398K. La hebra D se muestra en verde aqua, en el borde derecho de cada estructura.

Podemos conectar estos estados porque tenemos la trayectoria en el tiempo de las cinco simulaciones. Si cada simulación hubiera hecho algo distinto, tendríamos cinco ramas. El número a la derecha de cada estructura es el número del grupo al que pertenece (están ordenados por el número de conformeros asignados a ese grupo), y el número inferior indica el porcentaje de conformaciones que cada grupo tiene, referido al total de estructuras analizadas. Vemos que WIL permanece casi todo el tiempo en un estado prácticamente nativo, pero que puede poblar varios intermedios cuya característica principal es la desprotección de la hebra D. Esto es potencialmente peligroso, ya que esta hebra es de las zonas más amiloidogénicas de la proteína (aminoácidos 62 al 67, panel superior de la Figura 1).

Escape de la cuenca nativa

Al simular a 498K por fin logramos la desnaturalización completa de la proteína. Una coordenada de reacción muy utilizada por los que hacemos simulaciones de (des)plegamiento es la cantidad de contactos nativos, ya sea como el número real de contactos o como el porcentaje de contactos respecto al estado nativo (Q). Las siguientes dos gráficas muestran el comportamiento de diez trayectorias de desnaturalización para JTO y para WIL (Figura 5).

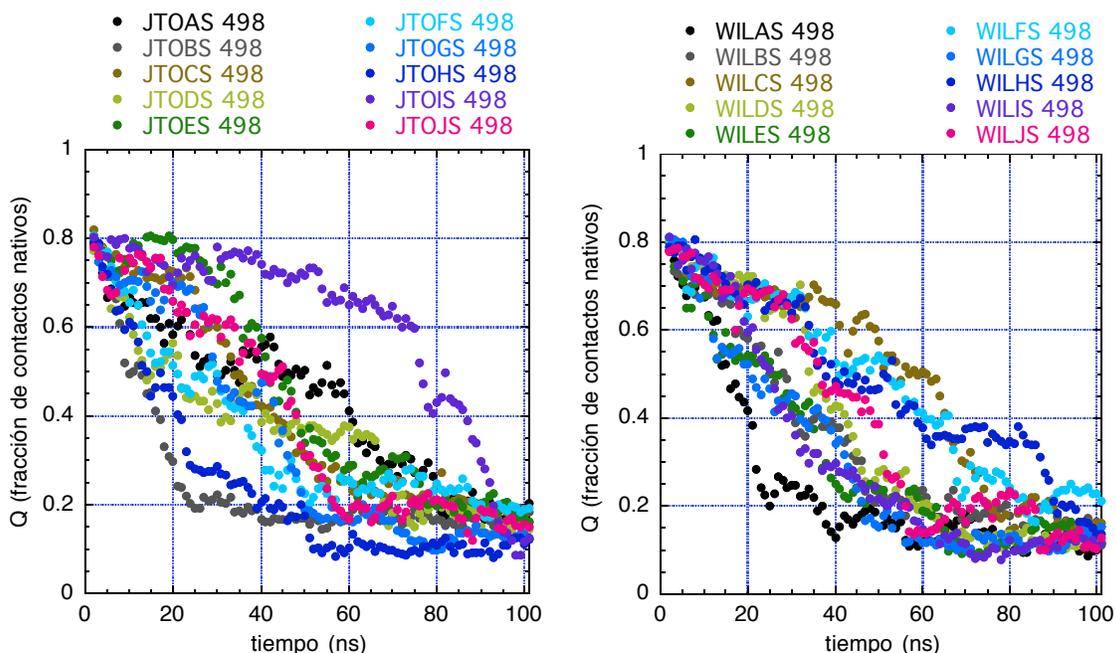


Figura 5. Cinética de pérdida de contactos nativos para diez simulaciones a 498K. JTO en el panel derecho, y WIL en el panel izquierdo. Cada simulación está marcada con un color diferente.

Hay varias cosas que saltan a la vista: para empezar, cada trayectoria es diferente, sugiriendo que hay más de una manera de salir de la cuenca nativa. Otra cosa notable es que los decaimientos no son exponenciales, sino que hay mesetas. Esto quiere decir que la proteína se queda “atorada” en conformaciones con un número relativamente estable de contactos nativos, por tiempos que pueden llegar a ser de varios nanosegundos. Estas conformaciones corresponden a mínimos locales en la superficie de energía libre por la que viaja la proteína, y por lo tanto, pueden ser considerados intermediarios de desplegamiento. También llama la atención el hecho de que varias simulaciones se detienen en los mismos puntos; una analogía geográfica podría ser una carretera local, que pasa por muchos pueblitos. Habrán viajeros que no se detengan en ninguno (JTOBS, por ejemplo), pero hay otros que aprovechan para conocer varios pueblitos (WILHS, por ejemplo).

Desafortunadamente, no hay una medida experimental directa de la cantidad de contactos nativos que tiene una proteína conforme se desnatura (a menos que uno haga experimentos de resonancia magnética nuclear con carbono 13, y mida acoplamiento dipolares entre estos núcleos). En el caso de estas cuatro proteínas, el desplegamiento inducido por urea se midió [19-21] siguiendo la emisión de fluorescencia del único triptofano de la proteína. En el estado nativo, este triptofano casi no emite fluorescencia, porque está muy cerca del único puente disulfuro, el cual apaga la fluorescencia. Además, está en un ambiente anhidro. Al desnaturarse la proteína, el triptofano se separa del puente disulfuro, y además se expone al solvente, resultando en un aumento notable en la eficiencia de la emisión de fluorescencia, y en un corrimiento del centro espectral hacia el rojo. Todos estos eventos son cuánticos, y por lo tanto, no se pueden calcular directamente de las simulaciones clásicas que hemos hecho. Lo que sí podemos hacer es calcular la distancia entre el indol del triptofano y uno de los azufres del puente disulfuro. Encontramos, mediante inspección visual de varias conformaciones de la proteína, que a distancias mayores de 8 Ångstroms el indol ya está suficientemente lejos del puente disulfuro como para no tener ninguna interacción con él. Usando esa distancia de corte,

preguntamos cuántas estructuras generadas en las simulaciones tienen distancias W – disulfuro mayores de 8 Ångstroms, y las graficamos contra el porcentaje de contactos nativos. A continuación se muestran los datos para JTO y para WIL en la Figura 6.

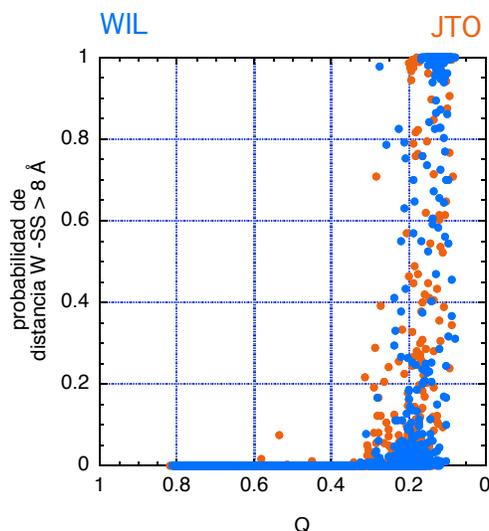


Figura 6. Probabilidad de encontrar al indol del triptófano a 8 Å o más del puente disulfuro, en función de la fracción de contactos nativos (Q) de la proteína. El estado nativo corresponde a Q cercano a 1, y el estado desnaturalizado a Q cercano a 0.

Es claro que de acuerdo a las simulaciones, sólo son capaces de emitir las proteínas que han perdido casi todos los contactos nativos, lo cual podría explicar por qué se pueden ajustar con un modelo de dos estados, a pesar de atorarse en múltiples etapas intermedias.

Otra medida experimental usada para seguir la desnaturalización es medir el radio de Stokes de las proteínas en columnas de exclusión molecular. El análogo directo en las simulaciones es el radio de giro. Los datos para JTO y WIL se presentan en la Figura 7.

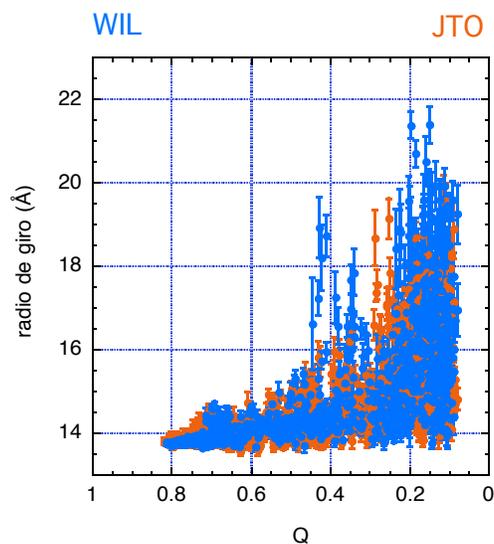


Figura 7. Radio de giro en función de la fracción de contactos nativos (Q).

Esta gráfica muestra claramente el embudo de plegamiento: cuando hay pocos contactos nativos, el radio de giro es grande y con alta variabilidad, mientras que al acercarse al estado nativo la proteína se compacta. Si comparamos el comportamiento de JTO con el de WIL, WIL tiene una población importante de conformaciones extendidas con una $Q \sim 0.4$, que no existe en JTO. En un espíritu especulativo y optimista, se podría proponer que en este grupo de estructuras se encuentran aquellas que hicieron que WIL muriera de amiloidosis, pero JTO no.

Agrupando las conformaciones visitadas por todas las simulaciones, y sabiendo de qué simulación y de qué tiempo provienen, podemos empezar a armar rutas de desnaturalización. A continuación (Figura 8) mostramos los estados iniciales de desnaturalización para G24.

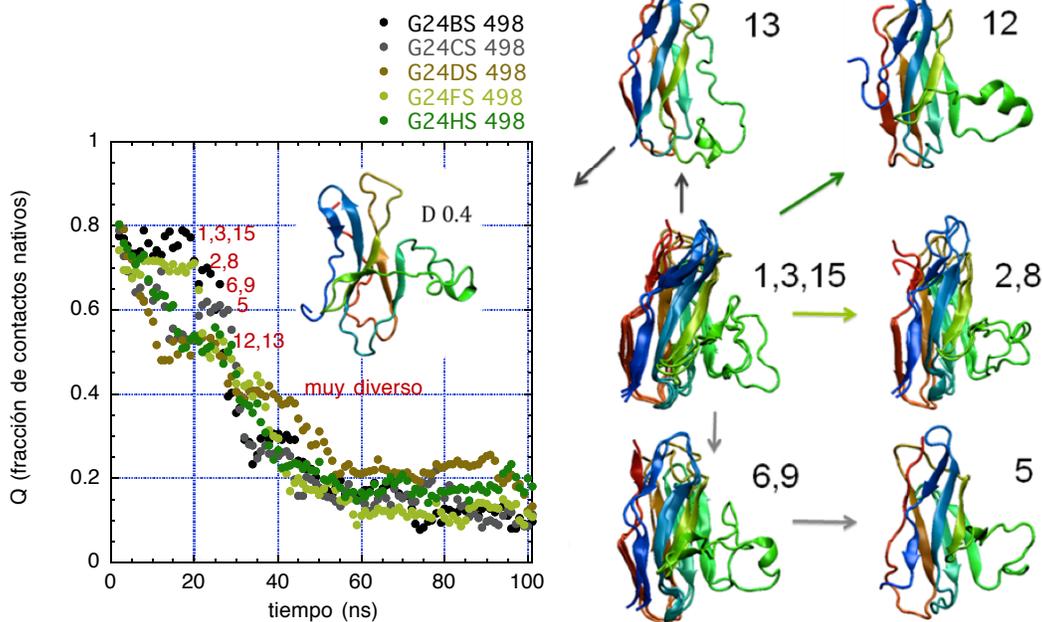


Figura 8. A la izquierda, cinética de pérdida de contactos nativos para cinco simulaciones a 498K de G24. En rojo se indican los números de las estructuras representativas con esa fracción de contactos nativos. La conexión temporal entre estas estructuras se muestra a la derecha; el color de las flechas corresponde con la simulación de la que provienen. La estructura marcada como "D 0.4" proviene de la simulación G24DS, y tiene una fracción de contactos nativos de 0.4, de la región marcada como "muy diverso".

En este caso, hemos podido identificar al menos cuatro rutas. A partir de $Q \sim 0.4$, las conformaciones son tan diferentes entre si que es imposible encontrar grupos con mas de tres miembros. Todavía nos falta encontrar monitores útiles para seguir estas rutas de desnaturalización, pero podemos ver que todas empiezan igual: desprotegen a la hebra D, e incluso llegan a deshacer su estructura secundaria (como en el grupo de la estructura 13).

Conclusión

Esperamos haber mostrado como se pueden utilizar simulaciones de dinámica molecular clásica para estudiar la variabilidad conformacional en el estado nativo y también las rutas de desplegamiento. Como en todo proceso de modelado, es muy importante estar consciente de las aproximaciones hechas, y de las limitaciones inherentes del modelo. Aun más importante, es

esencial regresar del mundo de la simulación al mundo real, calculando propiedades que sean lo más directamente comparables con datos experimentales. De esta manera, se establece un ciclo virtuoso de experimentos que motivan simulaciones que motivan a su vez más experimentos.

Agradecimientos

Proyecto financiado por CONACYT (102182 y 133294). Agradecemos el tiempo de cómputo generosamente proporcionado por el Centro Nacional de Supercómputo (San Luis Potosí), Kan Balam (DGSCA-UNAM), Sputnik II (Instituto de Biotecnología, UNAM), Orion (PROMEP-UAEM) y Entalpia (Facultad de Medicina, UNAM).

Referencias

1. Dill, K.A., Ozkan, S.B., Shell, M.S. y Weikl, T.R. (2008) *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 289-316
2. Anfinsen, C.B. (1973). *Science* **181**, 223–230
3. Korzhnev, D.M., Religa, T.L., Banachewicz, W., Fersht, A.R. y Kay, L.E. (2010) *Science* **329**, 1312-1316
4. Haustein, E. y Schwille, P. (2007) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 151-169
5. Bartlett, A.I. y Radford, S.E. (2009) *Nature Struct. Mol. Biol.* **16**, 582-588
6. Fersht, A.R., Matouschek, A. y Serrano, L. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 771-782
7. Fändrich, M., Fletcher, M.A. y Dobson, C.M. (2001) *Nature* **410**, 165-166
8. Chiti, F. y Dobson, C.M. (2006) *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333-366.
9. Fowler, D.M., Koulov, A.V., Balch, W.E. y Kelly, J.W. (2007) *Trends Biochem. Sci.* **32**, 217-224.
10. Luheshi, L.M., Hoyer, W., Pereira de Barros, T., van Dijk Härd, I., Brorsson, A-C., Macao, B., Persson, C., Crowther, D.C., Lomas, D.A., Ståhl, S., Dobson, C.M. y Härd, T. (2010) *PLoS Biology* **8**, e10000334
11. Bellotti, V., Mangione, P. y Merlini, G. (2000) *J. Struct. Biol.* **10**, 280-289.
12. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. y Matsudaira, P. (2008) *Molecular Cell Biology*, 6th Ed., W.H. Freeman and Company, New York, NY
13. Perfetti, V., Casarini, S., Palladini, G., Vignarelli, M.C., Klersy, C., Diegoli, M., Ascari, E. y Merlini, G. (2002) *Blood* **100**, 948-953
14. Merlini, G. y Bellotti, V. (2003) *New Engl. J. Med.* **349**, 583-596
15. Richardson, J.S. y Richardson, D.C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2754-2759
16. Goldschmidt, L., Teng, P.K., Reik, R. y Eisenberg, D. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 3487-3492
17. Poshusta, T.L., Sikkink, L.A., Leung, N., Clark, R.J., Dispenzieri, A. y Ramirez-Alvarado, M. (2009) *PLoS ONE* **4**, e5169
18. Pokkuluri, P.R., Solomon, A., Weiss, D.T., Stevens, F.J. y Schiffer, M. (1999) *Amyloid* **6**, 165-171
19. Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrcic, R., Stevens, F.J. y Solomon, A. (1999) *Biochemistry* **38**, 14101-14108
20. del Pozo Yauner, L., Ortiz, E., Sánchez, R., Sánchez-López, R., Güereca, L., Murphy, C.L., Allen, A., Wall, J.S., Fernández-Velasco, D.A., Solomon, A. y Becerril, B. (2008) *Proteins* **72**, 684-692
21. Blancas-Mejía, L.M., Téllez, L.A., del Pozo Yauner, L., Becerril, B., Sánchez-Ruiz, J.M. y Fernández-Velasco, D.A. (2009) *J. Mol. Biol.* **386**, 1153-1166
22. Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Fuentes-Silva, D., Ortiz, E., Rudiño-Piñera, E., Sánchez-López, R., Horjales, E., Becerril, B. y Rodríguez-Romero, A. (2010) *J. Mol. Biol.* **396**, 280-292
23. Chiti, F. y Dobson, C.M. (2009) *Nat. Chem. Biol.* **5**, 15-22

24. van Gunsteren, W.F., Bakowies, D., Baron, R., Chandrasekhar, I., Christen, M., Daura, X., Gee, P., Geerke, D.P., Glättli, A., Hünenberger, P.H., Katenholz, M.A., Oostenbrink, C., Schenk, M., Trzesniak, D., van der Vegt, N.F.A. y Yu, H.B. (2006) *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4064-4092
25. MacKerell Jr., A.D. (2004) *J. Comput. Chem.* **25**, 1584-1604
26. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O. y Shaw, D.E. (2010) *Proteins* **78**, 1950-1958
27. Cao, Z., Lin, Z., Wang, J. y Liu, H. (2009) *J. Comput. Chem.* **30**, 645-660
28. Kubelka, J., Hofrichter, J. y Eaton, W.A. (2004) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 76-88
29. Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L. y Schulten, K. (2005) *J. Comput. Chem.* **26**, 1781-1802
30. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D. y Lindahl, E. (2008) *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 435-447
31. Vendruscolo, M. y Dobson, C.M. (2011) *Current Biology* **21**, R68-R70
32. Shaw, D.E., Maragakis, P., Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Dror, R.O., Eastwood, M.P., Bank, J.A., Jumper, J.M., Salmon, J.K., Shan, Y. y Wriggers, W. (2010) *Science* **330**, 341-346
33. Bowman, G.R., Voelz, V.A. y Pande, V.S. (2011) *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 664-667
34. McCully, M.E., Beck, D.A. y Daggett, V. (2008) *Biochemistry* **47**, 7079-7089
35. Leone, V., Marinelli, F., Carloni, P. y Parrinello, M. (2010) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 148-154
36. Grant, B.J., Gorfe, A.A. y McCammon, J.A. (2010) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 142-147
37. Scheraga, H.A., Khalili, M. y Liwo, A. (2007) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 57-83
38. Jonsson, A.L., Scott, K.A. y Daggett, V. (2009) *Biophys. J.* **97**, 2958-2966
39. Day, R. y Daggett, V. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13445-13450
40. Go, N. (1983) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **12**, 183-210

Semblanza de la Dra. Nina Pastor



La Dra. Pastor cursó la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica (1986-1992) en la UNAM, y el Doctorado en Ciencias Biomédicas con especialización en biofísica (1992-1997) en la Mount Sinai School of Medicine de la City University of New York, en la ciudad de Nueva York, E.U.A. Se incorporó como profesor-investigador de tiempo completo en la Facultad de Ciencias de la UAEM en 1997. Actualmente es nivel 2 en el SNI. A la fecha cuenta con una veintena de publicaciones en revistas científicas internacionales. Su línea de investigación es la biofísica molecular, enfocada a los problemas de plegamiento funcional y anómalo de proteínas, termoestabilidad de proteínas y el reconocimiento específico entre proteínas y ácidos nucleicos, siempre buscando conectar el mundo microscópico de las simulaciones por dinámica molecular con problemas de interés bioquímico.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 67-78. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

SISTEMA DE INCOMPATIBILIDAD GAMETOFÍTICO EN PLANTAS: UNA OPORTUNIDAD PARA EVITAR LA ENDOGAMIA

GAMETOPHYTIC INCOMPATIBILITY SYSTEM IN PLANTS: ONE CHANCE TO AVOID ENDOGAMY

Beatriz Alejandra Ávila Castañeda, Felipe Cruz García
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM
Ciudad Universitaria, CP 04510, México DF
fcg@unam.mx

Resumen

Las plantas con flores hermafroditas tienen un sistema de incompatibilidad sexual que promueve la polinización cruzada, lo que repercute en un aumento de la diversidad genética de las generaciones futuras. La autoincompatibilidad (AI) permite reconocer y rechazar el polen propio y aceptar aquel de plantas genéticamente relacionadas. La AI se controla genéticamente por el locus multialélico S, el cual codifica las determinantes masculina –expresada en el polen- y la femenina –expresada en el pistilo-, especifican la reacción del reconocimiento y rechazo del polen. Además de las determinantes de especificidad, otros genes fuera del locus S, conocidos como genes modificadores (GM), completan la vía genética. En esta revisión describimos los avances en el campo de la AI y analizamos los mecanismos genéticos y bioquímicos que regulan la vía del rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasa en las familias Solanaceae, Rosaceae y Plantaginaceae.

Palabras clave: Incompatibilidad gametofítica, rechazo del polen, locus S, S-RNasa, SLF.

Abstract

Several plant families with hermaphrodite flowers have a sexual incompatibility system, which encourage them to cross-pollination to increase genetic diversity in future generations. Self-incompatibility (SI) allows recognizing and rejecting the self-pollen and accepting that coming from genetically related plants. The SI is genetically controlled by the highly polymorphic S-locus, which encodes the male –pollen expressed- and female determinants –pistil expressed- and defines the pollen rejection specificity. In addition to the specificity determinants, genes unlinked to the S-locus, called modifier genes are also essential to properly complete the genetic pathway. In this review, we analyze the genetic and biochemical mechanisms that regulate the pollen rejection response in S-RNase based systems in families such as Solanaceae, Rosaceae y Plantaginaceae.

Keywords: Gametophytic incompatibility, pollen rejection, S-locus, S-RNase. SLF.

Introducción

De acuerdo al World Conservation Monitoring Center se conocen cerca de 250,000 plantas con flores (angiospermas) en la tierra. Su asombrosa distribución es consecuencia de su gran capacidad de diversificación y especiación.

El éxito evolutivo de las angiospermas va de la mano con su adaptación reproductiva sexual, la flor. La mayoría de estas plantas incluyen el órgano femenino (pistilo) y el masculino (estambres) en la misma flor. La proximidad de estas estructuras aumenta la probabilidad de la autofecundación, lo que de repetirse de manera reiterada, provocará en generaciones futuras una depresión genética de la especie por endogamia.

¿Cómo evitan las plantas con flores bisexuales la autofecundación? Esta pregunta ha estado en la mente de muchos científicos desde los tiempos de Darwin, quien observó que las angiospermas habían desarrollado mecanismos que evitaban la autopolinización para disminuir la probabilidad de la autofecundación. En este sentido Darwin describió el fenómeno como...

“Difícilmente existe algo más maravilloso en la naturaleza que la sensibilidad de los elementos sexuales a las influencias externas, y la delicadeza de sus afinidades... Podemos ver la sensibilidad de los elementos sexuales de estas plantas, las cuales son completamente estériles con su propio polen, pero son fértiles con cualquier otro individuo de la misma especie” (Darwin, 1878; p 467) [1].

Hoy en día se sabe que muchas familias de angiospermas han tratado de evitar de varias maneras este problema de compatibilidad sexual y han evolucionado entre otros, un mecanismo genético-bioquímico que les permite reconocer y eliminar su propio polen para promover la polinización cruzada. Este hecho les permite a las plantas aumentar la capacidad de sobrevivencia y reproducción para contribuir a la diversidad genética de la siguiente generación.

Sistemas de incompatibilidad

La incompatibilidad sexual se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir semillas después de la autopolinización [2, 3].

La fecundación es un proceso muy dinámico derivado de una serie de interacciones entre el gametofito masculino (grano de polen) y el órgano femenino, el gineceo o pistilo. El gineceo está compuesto de una superficie receptora de polen, el estigma, una estructura que conduce a los tubos polínicos el estilo y del órgano que porta los óvulos, el ovario. De esta manera, el pistilo se encarga de reconocer y rechazar los granos de polen que produce la misma planta, pero acepta aquellos granos de polen genéticamente relacionados, germinen y sus tubos polínicos alcancen el ovario para que ocurra la fecundación de sus óvulos. Este proceso le permite a las siguientes generaciones aumentar su diversidad genética.

En varias familias el reconocimiento y rechazo del polen está controlado genéticamente por un solo locus altamente polimórfico, conocido como el locus *S*. En él, se alojan dos genes fuertemente ligados, una unidad transcripcional codifica la determinante masculina con expresión específica en el polen y la otra, a la determinante femenina que se expresa exclusivamente en el pistilo. El reconocimiento *S*-específico de estos dos factores conducen a la discriminación e inhibición de la germinación del polen o del tubo polínico en crecimiento, producido por la misma planta o de aquel genéticamente muy relacionado.

Sistema de incompatibilidad gametofítico dependiente de S-RNasa

Los sistemas de incompatibilidad gametofíticos (SIG) se han estudiado intensamente en familias de importancia agrícola como Solanaceae y Rosaceae. En este caso, la respuesta del rechazo del polen se lleva a cabo en el primer tercio del estilo, donde sus células secretan una serie de factores determinantes para nutrir y guiar al tubo polínico (TP) hacia el ovario. Sin embargo, en estas familias también el estilo produce las moléculas citotóxicas que ingresan al TP inhibiendo su crecimiento si la cruza es incompatible [4, 5].

La S-RNasa es la determinante femenina

Anderson *et al.* (1986) identificaron el gen de la determinante femenina en *Nicotiana glauca*, una solanácea. Este gen codifica una glicoproteína con actividad de ribonucleasa, conocida como S-RNasa. Las ribonucleasas *S* son proteínas altamente polimórficas y su porcentaje de similitud oscila entre el 35 y 96%. La S-RNasa es una proteína que se expresa específicamente en las células del tejido de transmisión estilar y en el ovario. Su localización final es en el espacio extracelular del tejido de transmisión, que es el lugar por donde los TPs crecen hacia el ovario [4, 6, 7, 8, 9]. El máximo pico de expresión de las S-RNasas en el pistilo (alrededor del 10% de la proteína total estilar) es en la madurez, justo cuando la flor abre [10]. En el estilo, las S-RNasas se concentran principalmente en el primer tercio de los estilos, lo que coincide con el sitio en el que el rechazo del polen tiene lugar en *Nicotiana* y *Petunia* [11]. Los experimentos de ganancia y pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* y *Petunia* demostraron que las S-RNasas son necesarias y suficientes para que el pistilo reconozca y rechace el polen propio [12, 13]. Por ejemplo, plantas transgénicas de *P. inflata* con genotipo S_1S_2 que expresan el transgen de la S_3 -RNasa, adquieren la capacidad de rechazar el polen S_3 . Por otro lado, líneas transgénicas de *Petunia* con genotipo S_2S_3 y transformadas con el transgen en antisentido de la S_3 -RNasa, perdieron la capacidad de rechazar el polen S_3 , pero mantuvieron la capacidad de reconocer y rechazar el polen S_2 [12]. Estos datos permitieron establecer de manera contundente que la S-RNasa es la determinante femenina en especies AI de las solanáceas.

La acción de la S-RNasa en el rechazo del polen es mediante su actividad citotóxica de degradación del RNA del TP [4]. Las S-RNasas son glicoproteínas básicas de 30kD [4], la fracción de hidratos de carbono que las componen no se requiere para su actividad de RNasas ni tampoco para su función de reconocimiento alelo S-específico. Las estructuras cristalográficas de las S-RNasas de *N. alata* y de *Pyrus pyrifolia* son muy similares a la RNasa fúngica T2 [14]. Huang *et al.* (1994) demostraron por mutagénesis dirigida, que las S-RNasas se comportan como agentes citotóxicos. Este grupo reemplazó una de las dos histidinas conservadas en el sitio activo de la S₃-RNasa de *Petunia Inflata* y la uso para transformar plantas de *P. Inflata*. Los pistilos de las plantas transgénicas resultantes fueron incapaces de rechazar el polen S₃ debido a la incapacidad de la S₃-RNasa para degradar el RNA del TP. Un dato que refuerza este hecho, fue el obtenido de un cultivar compatible del jitomate silvestre *-Lycopersicon peruvianum-*, el cual codifica y expresa S-RNasas inactivas debido a una mutación en una de las histidinas del sitio activo [15, 16], corroborando que las S-RNasas funcionan como citotoxinas en el TP.

Comparando las secuencias de diferentes S-RNasas de solanáceas, se revela que estas proteínas presentan cinco regiones conservadas nombradas de la C1 a la C5 y dos regiones hipervariables HVa y HVb [17]. La estructura tridimensional de una S-RNasa de *N. alata* indica que las HVa y HVb se localizan en la superficie de la molécula, sugiriendo que son estas las regiones involucradas en la interacción alelo S específica con la determinante masculina [18]. Sin embargo, experimentos de intercambio de dominios en *P. inflata* y en *N. alata* demuestran que estas regiones hipervariables son necesarias pero no suficientes para determinar la especificidad alélica de las S-RNasas [5, 19], por lo que todavía es desconocido qué aminoácidos de la S-RNasa están implicados en el reconocimiento alelo S-específico.

SLF es una proteína con caja F y la determinante masculina

Después de identificar a la determinante femenina (S-RNasa), 18 años después se clonó el gen que codifica para la determinante masculina en los sistemas de incompatibilidad basados en S-RNasa. Su identificación, partió de la secuenciación genómica del locus S, en *Anthirrhinum* (Plantaginaceae) [20], en Rosaceae [21, 22] y en *Petunia inflata*, una especie de la familia Solanaceae [23]. En estas plantas se realizó una caminata genómica desde el locus del gen S₂-RNasa. Notablemente, un gen localizado 161 kb río abajo de este, con un marco de lectura abierto para una proteína con homología a aquellas con caja F llamó mucho su atención, su transcrito presentó una acumulación específica en el polen maduro y en los tubos polínicos, una característica deseada para cualquier candidato a ser la determinante masculina [23]. Este gen fue denominado *PiSLF* (*P. inflata* S-Locus F-box protein), a la cual nos referiremos como SLF.

La evidencia experimental que demostró que el gen *SLF* era la determinante masculina fue aportada por Sijacic *et al.* (2004) [24]. Los experimentos realizados se basaron en el modelo de la interacción competitiva [25]. Este fenómeno ocurre en plantas de *N. alata* mutantes que codifican y expresan en el polen dos alelos S diferentes. Esta situación se registró después de que plantas irradiadas duplicaron la región del locus S, pero solo la que codifica la determinante masculina, o en plantas tetraploides. De esta manera, los granos de polen producidos por estas plantas mutantes segregaron con genotipos heteroalélicos u homoalélicos. Si los granos de polen son heteroalélicos son aceptados por un pistilo donde coincida su haplotipo, pero si son homoalélicos son rechazados. De acuerdo con lo anterior, Sijacic *et al.* (2004) transformaron plantas incompatibles de *P. inflata* S₁S₁, S₁S₂, y S₂S₃, con el transgen *SLF*₋₂ fusionado a un promotor específico de polen, las plantas transgénicas resultantes produjeron un polen homoalélico (*SLF*₂ + S₂) ó heteroalélico (*SLF*₂ + S₁ ó *SLF*₂ + S₃). Los resultados mostraron que sólo el polen heteroalélico fue aceptado por interacción competitiva, pero no aquél proveniente de las plantas que produjeron polen homoalélico. Por lo tanto, estos datos demostraron fehacientemente que *SLF* es la determinante masculina en los sistemas de incompatibilidad basados en S-RNasa. Otros resultados que confirmaron que *SLF* es la determinante masculina son los brindados por Lai *et al.* (2002) [20] y Qiao *et al.* (2004) [26] en *Antirrhinum hispanicum*,

un miembro de la familia Plantaginaceae. En esta especie, el gen *AhSLF₂* se clonó y expresó en el polen de plantas incompatibles del homócigo de *P. hybrida S₃S₃*. Las plantas transgénicas que expresaron a *AhSLF₂* y produjeron polen heteroalélico *S₃AhSLF₂*, fueron incapaces de rechazar el polen *S₂*. De esta manera, se concluyó que el gen *AhSLF₂* estaba implicado en la incompatibilidad en esta especie.

La proteína SLF incluye en su extremo N-terminal un dominio con caja F. La mayoría de las proteínas con caja F funcionan como proteínas E3 ligasas, las cuales forman parte del complejo SCF (Skp1-Cullin-F-Box). Este complejo, junto con la enzima E1 que une a la ubiquitina y la enzima de conjugación E2, median la poliubiquitinación de proteínas blanco para su degradación en el proteosoma 26S [27, 28, 29, 30]. En este sistema de degradación de proteínas, se propone que la proteína E3 ligasa que transfiere a la ubiquitina sería SLF.

Factores no ligados al locus S

Por definición la interacción S-específica entre la S-RNasa y SLF definen y desencadenan la AI; sin embargo, estas no son suficiente para completar la respuesta del rechazo del polen, porque la evidencia genética y bioquímica señalan que se requieren factores adicionales no ligados al locus S, conocidos como genes modificadores (GM).

Los esfuerzos para identificar GM en sistemas basados en S-RNasa han descansado en estrategias bioquímicas y genéticas.

Proteínas que interactúan físicamente con la S-RNasa

Proteínas estilares

Mediante ensayos de interacción proteína-proteína, utilizando como anzuelo a la S-RNasa Cruz-García *et al.* (2003; 2005) [31, 32] identificaron proteínas estilares que forman complejos con las S-RNasas. Estas fueron tres arabinogalactoproteínas: 1) PELP III (Pistil extensin-like protein III), 2) TTS (transmitting tract specific glycoprotein) y 3) 120K [33, 34, 35, 36]. Finalmente, se identificó una cuarta proteína nombrada p11, la cual tienen similitud con una quimiocianina con actividad quimioatrayente de tubos polínicos de *Lilium longiflorum* [37].

La proteína de *N. alata*, NaTTS funciona directamente en la guía y en la nutrición del TP por el estilo [36, 38], aunque su función en la AI no se ha evaluado. La función de la proteína PELP parece estar ligada en el crecimiento del TP al integrarse a la pared de callosa de éste [33].

Por su parte, Nap11 (*N. alata* p11) es una proteína que se expresa abundantemente en estilo y ovario, posee un dominio de unión a cobre y su función en la AI es aún desconocida. Aunque se ha descrito que en *Arabidopsis thaliana* y *Lilium longiflorum* posee propiedades quimioatrayentes [37, 39], sugiriendo que en estas especies su función podría estar asociada a la guía del TP hacia el saco embrionario. La única proteína que se sabe que participa directamente en la incompatibilidad en *Nicotiana* es 120K [40].

Notablemente, experimentos de pérdida de función demuestran que 120K es una proteína esencial en la respuesta del rechazo del polen en *Nicotiana* [40]. La proteína 120K se asocia a vacuolas del TP, ya que experimentos de inmunolocalización indican que colocaliza con una pirofosfatasa vacuolar [41]. Además, ensayos interacción proteína-proteína por medio del doble híbrido en levaduras, señalan que el extremo C-terminal de 120K interactúa con una proteína específica de polen nombrada NaPCCP (Pollen C2 domain-containing proteins) [42]. Esta proteína une a PI3P lo que la asocia a la membrana plasmática y a las vesículas del TP,

inclusive experimentos de localización de NaPCCP:GFP indican su presencia en el sistema endosomal [42, 43].

Proteínas del polen

La proteína del polen SBP (S-RNase binding protein), se encontró en un ensayo de doble híbrido en levaduras, utilizando el extremo C-terminal de la S-RNasa como anzuelo. Esta proteína incluye una región rica en cisteínas que con un dominio RING-HC, el cual esta presente en cierto tipo de ligasas E3 [44]. La proteína SBP Interacciona *in vitro* con proteínas como cullin 1 y proteínas de conjugación E2 que, junto con las ligasas E3, son parte del complejo SCF de marcaje por ubiquitinación de proteínas que serán degradadas por el proteosoma 26S [26]. Aunque su función no es clara en la AI, se propone que SBP funciona como un factor importante durante la respuesta del rechazo del polen [45, 46]. Notablemente, Huang *et al.* (2007) [47] y Zhao *et al.* (2003) [48] encontraron que en *P. inflata* una proteína parecida a SBP, PiSBP, es parte de un complejo SCF no convencional, ya que SLF interactúa con una proteína cullin (PiCUL1-G) y una proteína RING-HC, PiSBP1 (*P. inflata* S-RNase Binding Protein 1), pero no se han observado que interaccione con proteínas tipo Skp1 o Rbx1 [44].

Factores que se expresan diferencialmente entre plantas incompatibles y compatibles de *Nicotiana*

NaTrxh

El transcrito de *NaTrxh* se encontró mediante ensayos de cDNA-AFLP, como un RNAm con mayor presencia en plantas con entorno genético de AI como el de *N. alata* BT que en plantas compatibles de *N. plumbaginifolia*. Estos experimentos permitieron detectar que tanto el RNAm como la proteína NaTrxh se acumula mayoritariamente en *N. alata* (Cruz-García, no publicado).

Las tiorredoxinas son proteínas que ayudan a regular el estado redox de la célula reduciendo los puentes disulfuro de sus proteínas blanco. Juárez-Díaz *et al.* (2006) [49] encontraron que la NaTrxh se secreta a la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, sin tener un péptido señal y que además interacciona físicamente con la S-RNasa, reduciendo sus puentes disulfuro. Actualmente se están llevando experimentos de pérdida de función para determinar el papel de NaTrxh en la AI en *Nicotiana*.

HT-B

La proteína HT-B es de 8.6 kDa y presenta un dominio (ND) rico en asparagina y ácido aspártico en su extremo C-terminal [50]. El transcrito y la proteína HT-B son específicos de estilos maduros de plantas de *Nicotiana* y de *Petunia Solanum*. [50, 51, 52, 53, 54].

Cuando se suprimió la expresión de HT-B por antisentido y RNAi en *Nicotiana*, *Solanum* y *Petunia* se encontró que HT-B es esencial en la AI, dado que las plantas, con HT-B suprimida, no fueron capaces de reconocer y rechazar su propio polen [50, 54].

La proteína HT-B, al igual que 120K, son proteínas asociadas al sistema endomembranoso del TP. Por su parte, HT-B se encuentra en la fracción microsomal de un fraccionamiento subcelular de TPs, su asociación podría ocurrir por una modificación lipídica en su dominio ND, ya que este esta flanqueado por dos motivos de cisteínas CAACKC y CQTVCC que se presumen como motivos susceptibles de palmitoilación [41, 55].

HT-B es una proteína que se integra a los TPs. Interesantemente, si la polinización es compatible HT-B se degrada, una situación que no ocurre en una cruce incompatible [41].

NaStEP

En la búsqueda de genes fuera del locus S y con alto potencial de estar involucrados en la AI en *Nicotiana*, se identificó a *NaStEP* (*N. alata* Stigma Expressed Protein). La proteína NaStEP es ácida y se expresa abundantemente en estigmas AI de *Nicotiana*. Además, tiene homología con inhibidores de proteasas tipo Kunitz.

Un análisis de la secuencia de aminoácidos de NaStEP indica que tienen una señal de destino vacuolar (NPVIL) en su extremo N-terminal. Su localización subcelular se corroboró mediante ensayos de inmunohistoquímica. Estos estudios arrojaron datos que indican que en efecto, NaStEP se localiza en las vacuolas de las células del estigma. Aunque después de la polinización NaStEP se libera al exudado del estigma. Además, un inmunoanálisis indica que NaStEP se acumula abundantemente en estigmas de plantas con entornos genéticos de AI como *N. forgetiana*, *N. alata*, y *N. bonariensis*, pero no es detectable en especies compatibles como: *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *N. benthamiana*, *N. longiflora* y *N. glauca*. Este dato es interesante ya que NaStEP puede participar directamente en la respuesta del rechazo del polen en *Nicotiana* [56]. Nuestros estudios están dirigidos por el momento en determinar si la supresión de NaStEP abate la capacidad de rechazar el polen en una manera S-específica en *Nicotiana*.

Modelo del SIG basado en S-RNasas

Modelo de la degradación de las S-RNasas

Para describir este modelo supondremos que un estilo S_1S_2 es polinizado con polen S_1 . En este ejemplo, tanto la S_1 como la S_2 -RNasa producidas por el estilo son transportadas al interior del TP. En este caso la determinante masculina en el TP es SLF_1 , la cual mediará específicamente la ubiquitinación y la degradación de la S_2 -RNasa por el proteosoma 26S, pero no de la S_1 -RNasa, permitiendo que esta ribonucleasa ejerza su efecto citotóxico e inhiba el crecimiento del TP S_1 . En este modelo se sugiere que la interacción S-inespecífica entre SLF_1 y la S-RNasa es más fuerte que la interacción SLF_1 con la S-RNasa S-específica. Lo anterior se cumple muy bien en una cruce compatible. Por ejemplo, si la polinización ocurre entre un estilo S_1S_2 y el polen S_3 , se formarán en el interior del TP complejos estables S_1 -RNasa- SLF_3 y S_2 -RNasa- SLF_3 , lo que provocaría la degradación de ambas S-RNasas y la estabilidad del RNA del TP no se verá afectada, permitiéndole al TP alcanzar el ovario (Fig. 1).

Modelo para la compartimentalización de las S-RNasas

Un modelo alternativo para explicar el rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasa fue propuesto por Goldraij *et al.* (2006) [41]. El modelo propone que las S-RNasas ingresan a los TPs por endocitosis no importando su haplotipo S. Este modelo además de la S-RNasa y SLF_1 incluye a los GM estilares *120K* y *HT-B*, como componentes de un sistema selectivo del rechazo del polen secretado a la matriz extracelular del estilo.

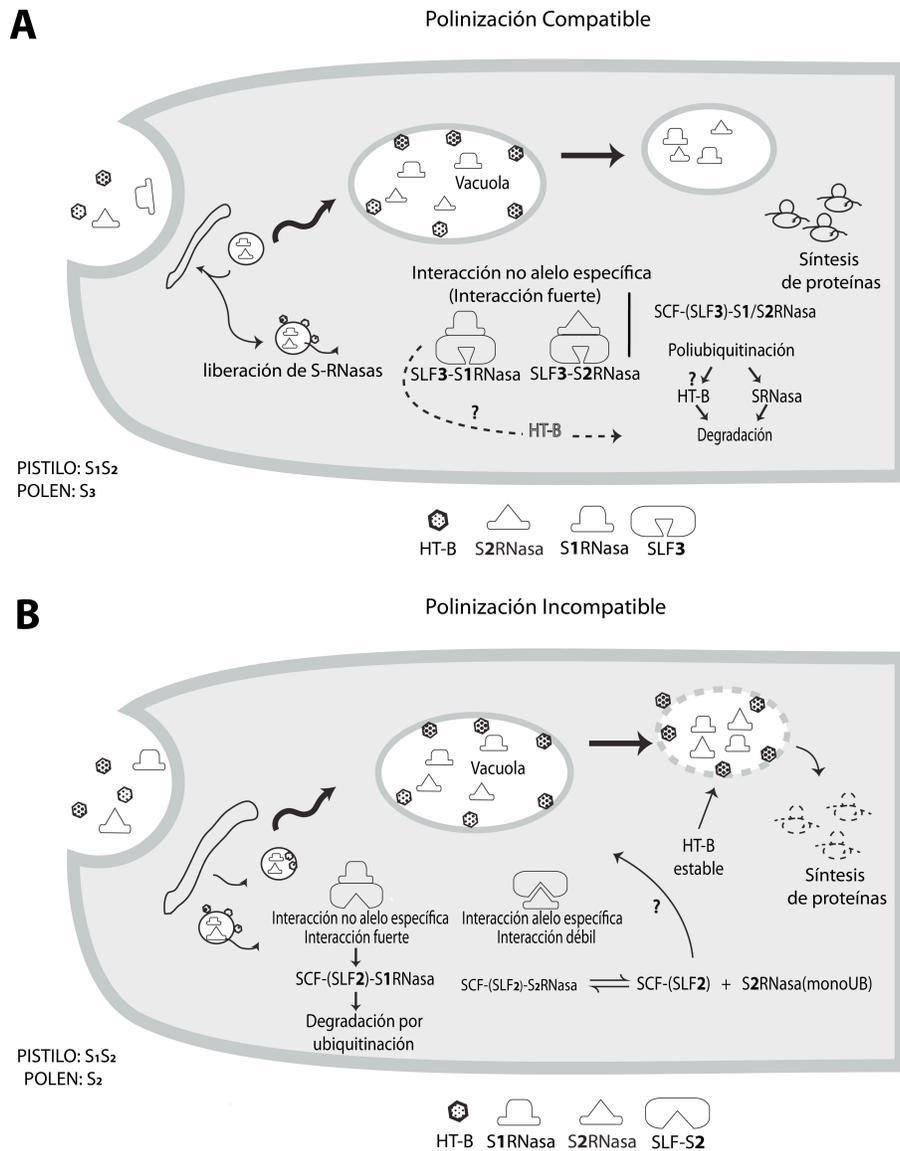


Figura 1. Modelo mixto del rechazo del polen. **(A)** Polinización Compatible. Las S₁ y S₂-RNasas se almacenan en una vacuola. Se libera una pequeña porción de las S-RNasas al citoplasma del TP, donde interacciona de manera S-inespecífica con SLF₃. El complejo SCF-SLF₃ poliubiquitina a la S₁ y S₂-RNasa para su degradación por el proteosoma 26S. Además, se propone que la degradación de HT-B es crucial para que la vacuola que contiene el TP ocurre porque es blanco del complejo SCF-SLF₃. Alternativamente, HT-B podría ser degradada por una vía no descrita. Como quiera que ocurra, la degradación de HT-B es esencial para que la vacuola que contiene a las S-RNasas permanezca intacta y el TP continúe su crecimiento al ovario. **(B)** Polinización Incompatible. Las S₁ y S₂ RNasas también se almacenan en una vacuola. Se libera una porción de ellas al citoplasma del TP y se forman dos tipos de complejos con SLF: uno S-inespecífico y otro S-específico. La interacción S-inespecífica conduce a la degradación de la S-RNasa (como en la cruz compatible). En cambio la interacción S-específica, tienen menor afinidad y conlleva a la monoubiquitinación de la S₁-RNasa; la cual es una señal para transportar a la S₂-RNasa a la vacuola. Por otro lado, la proteína HT-B no es degradada y provoca la ruptura y la liberación masiva de las S-RNasas que afectan la síntesis de proteínas y con ello el crecimiento del TP.

Por ejemplo, bajo este modelo un tubo polínico proveniente de un grano de polen S_1 creciendo en un pistilo heterocigoto S_2S_3 , evita ser rechazado porque tanto las S_2 -RNAsas como las S_3 -RNAsas permanecerán secuestradas en una vacuola del TP, como consecuencia de la degradación de HT-B. Por otro lado, en el caso de un polen S_2 o S_3 , cuyos tubos polínicos se desarrollen en un estilo S_2S_3 , la proteína HT-B que ha ingresado al tubo polínico se estabilizará y la vacuola será degradada liberando a la S_2 -RNasa y a la S_3 -RNasa al citoplasma del TP, en donde ejercerán su efecto citotóxico para inhibir el crecimiento del TP [41].

La interacción SLF_1 - S_1 -RNasa debe ser dominante sobre la interacción SLF_1 - S_2 -RNasa. De esta forma, si la interacción SLF_1 - S_1 -RNasa en una cruce incompatible ocurre, HT-B se estabilizará evitando su degradación. En el caso de una cruce compatible los complejos serán SLF_1 - S_2 -RNasa, lo que provocará la degradación de HT-B. El mecanismo mediante el cual esto ocurre es desconocido y el efecto podría ser indirecto. Por ejemplo, HT-B podría ser degradada o estabilizada por una proteína hipotética del polen.

Aunque el modelo de la degradación de la S-RNasa no involucra a las proteínas estilares HT-B y 120K, ambos modelos sostienen que la AI depende de la interacción específica de SLF con la S-RNasa. Quizás parte de la discrepancia entre ambos se deba a que se desconocen todos los factores estilares y del polen que son parte de la vía del rechazo del polen. De hecho, el único factor polínico que se conoce es SLF en *Antirrhinum*, *Petunia* y en algunas rosáceas.

Modelo mixto de rechazo del polen

Los avances científicos se resumen en los modelos descritos anteriormente. Sin embargo, han causado una gran controversia, porque en principio son contradictorios, ya que el modelo de la degradación de las S-RNAsas propone que la interacción S-específica entre SLF y la S-RNasa es muy débil y que el equilibrio favorece la forma libre de a S-RNasa, que destruirá el RNA del TP. Sin embargo, el modelo de la compartimentalización argumenta que la interacción S-específica entre SLF y la S-RNasa solo dispara la cascada de AI y que la ruptura de la vacuola que contiene a las S-RNAsas es lo que provoca la degradación masiva del RNA en el TP. Un dato que apoya este modelo es que en las plantas transgénicas donde se encuentran silenciadas HT-B y 120K, la interacción S-específica entre SLF y la S-RNasa también ocurre y si la S-RNasa quedara libre como lo proponen Hua y Kao, (2008) [58] entonces habría rechazo del polen. Sin embargo, no sucede así. No obstante, nosotros consideramos que ambos modelos pueden integrarse en uno solo al que llamamos modelo mixto de rechazo del polen (Jiménez-Durán y Cruz-García, en prensa).

En este modelo sugerimos que en una cruce compatible, cuando un estilo heterocigoto S_1S_2 es polinizado con polen S_3 , la S_1 -RNasa y la S_2 -RNasa, formarán complejos S-inespecíficos con SLF_3 y serán degradadas por el proteosoma 26S, de acuerdo con Hua y Kao, (2008) [58]. Esta interacción S-inespecífica podría además provocar que el complejo SCF con SLF_3 ubiquitinara a la proteína HT-B para su degradación también por el proteosoma 26S, o estimular su degradación por otra vía desconocida. Lo importante aquí sería la degradación de HT-B y la consecuente estabilización de las vacuolas para contener la actividad citotóxica de las S-RNAsas. Por el contrario, en una cruce AI los complejos SLF_1 con la S_2 -RNasa será S-inespecíficos y seguirá la ruta de degradación del proteosoma 26S. Sin embargo, el complejo SCF- SLF_1 se unirá con menor afinidad a la S_1 -RNasa, desplazando el equilibrio hacia formas libres de SLF_1 y de la S_1 -RNasa. Bajo este escenario, la S-RNasa libre podría atacar el RNA del TP. No obstante, los datos apuntan a que no lo hace, porque en ausencia de HT-B o 120K en plantas silenciadas [40, 50], el TP incompatible continua creciendo hacia el ovario. Una posible explicación de porque no ocurre la degradación del RNA, es porque el complejo SCF- SLF_1 en el corto tiempo que se une a la S_1 -RNasa podría monoubiquitinarla y confinarla al sistema endomembranoso del TP para contener su actividad. Hay un dato que sustenta esta hipótesis y

fue el brindado por el trabajo de Meng *et al.* (2010) [59], quienes sobreexpresaron S-RNasas en TPs y observaron que estas ribonucleasas no degradan el RNA, si no por el contrario, son secuestradas en un compartimento del sistema endomembranoso del TP. En cualquier caso la proteína HT-B en el TP juega un papel crucial para mediar la ruptura de la vacuola que contiene a las S-RNasas liberándolas al citoplasma del TP donde atacarán al RNA e inhibirán el crecimiento del TP.

Agradecimientos

DGAPA IN205009. CONACYT 81968

Referencias

1. McClure, B. (2009) *J. Exp. Bot.* **60**, 1069-1081
2. De Nettancourt, D. (1977) *Sex. Plant Rep.* **10**, 185-199
3. De Nettancourt, D. (2001) *Incompatibility in Angiosperms: Monographs on theoretical and applied genetics*, 3rd Ed., Springer-Verlag, NY
4. McClure, B., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., y Clarke A. E. (1989) *Nature* **342**, 955-957
5. Kao, T. H. y McCubbin, A. G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 12059-12065
6. Anderson, M. A., Cornish, E. C., Mau, S. L., Williams, E. G., Hoggart, R., Atkinson, A., Böning, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P. J., Haley, J. D., Penschow, J. D., Niall, H. D., Tregear, G. W., Coughlan, J. P., Crawford, R. J. y Clarke, A. E. (1986) *Nature* **321**, 38-44
7. Cornish, E. C., Anderson, M. A. y Clarke, A. E. (1988) *Ann. Rev. Cell and Dev. Biol.* **4**, 209-228
8. Sassa, H., Nishio, T., Kowyama, Y., Hirano, H., Koba, T. y Ikehashi, H. (1996) *Mol. Gen. Genet.* **27**, 222
9. Xue, Y. B., Carpenter, R., Dickinson, H. G., y Coen, E. S. (1996) *Plant Cell.* **8**, 805-814
10. Roalson, E. H. y McCubbin, A. G. (2003) *Mol. Phylogenet. Evol.* **29**, 490-506
11. Ai, Y., Kron, E. y Kao T. H. (1991) *Mol. Gen. Genet.* **230**, 353-358
12. Lee, H. S., Huang, S., y Kao, T. H. (1994) *Nature* **367**, 560
13. Murffet, J., Atherto, T. L., Mou, B., Gasser, C. S. y McClure, B. (1994) *Nature* **367**, 563-566
14. Ida, K., Norioka, S., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yamashita, E., Newbigin, E., Clarke, A. E., Sakiyama, F. y Sato, M. (2001) *J. Mol. Biol.* **314**, 103-112
15. Kowyama, Y., Kunz, C., Lewis, I., Newbigin, E., Clarke, A. E. y Anderson, M.A. (1994) *Theor. Appl. Genet.* **88**, 859
16. Royo, J., Kunz, C., Kowyama, Y., Anderson, M., Clarke, A. E. y Newbigin, E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 6511
17. Ioerger, T. R., Gohlke, J. R., Xu, B. y Kao, T. H. (1991) *Sex. Plant Reprod.* **4**, 81
18. Ida, K., Norioka, S., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yamashita, E., Newbigin, E., Clarke, A. E., Sakiyama, F. y Sato, M. (2001) *J. Mol. Biol.* **314**, 103-112
19. Zurek, D. M., Mou, B., Beecher, B. y McClure, B. (1997) *Plant J.* **11**, 797-808
20. Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G. y Xue, Y. (2002) *Plant Mol. Biol.* **50**, 29-42

21. Entani, T., Zwano, M., Shiba, H., Che, F.S., Isogai, A. y Takayama, S. (2003) *Genes Cells* **8**, 203-213
22. Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M. Tao, R. y Hirano, H. (2003) *Plant Cell* **15**, 771-781
23. Wang, Y., Tsukamoto, T., Yi, K. W, Wang, X., Huang, S., McCubbin, A. G. y Kao, T. H. (2004) *Plant Mol. Biol.* **54**, 727-742
24. Sijacic, P., Wang, X., Skirpa, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., Huang, S., y Kao, T. H. (2004) *Nature* **429**, 302-305
25. Golz, J. F. H., Oh, Y., Su, V., Kusaba, M. y Newbiggin, E. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 15372-15376
26. Qiao, H., Wang, H., Zhao, L., Huang, J., Zhang, Y., y Xue, Y. (2004) *Plant Cell* **16**, 586-593
27. Hershko, A. y Ciechanover, A. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479
28. Tyers, M. y Jorgensen, P. (2000) *Curr. Op. Gen. Dev.* **10**, 54-64
29. Moon, J., Parry, G. y Estelle, M. (2004) *Plant Cell.* **16**, 3181-3195
30. Smalle, J. y Vierstra, R. D. (2004) *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 555-590
31. Cruz-García, F., Hancock, C. N. y McClure, B. (2003) *J. Exp. Bot.* **53**, 123-130
32. Cruz-García F, Hancock, C.N., Kim, D. y McClure, B. (2005) *Plant J.* **42**, 295-304
33. de Graaf, B. H. J., Knuiman, B.A., Derksen, J. y Mariani, C. (2003) *J. Exp. Biol.* **54**, 55-63
34. Schultz, C. J., Hauser, K., Lind, J. L., Atkinson, A. H., Pu, Z. Y., Anderson, M. A. y Clarke, A. E. (1997) *Plant Mol. Biol.* **35**, 833-845
35. Wu, H., Wang, H. y Cheung, A. Y. (1995) *Cell* **83**, 395-403
36. Wu, H., Wong, E., Ogdahl, J. y Cheung, A. Y. (2000) *Plant J.* **22**, 165-176
37. Kim, S., Mollet, J. C., Dong, J., Zhang, K., Park, S. y Lord, E. M. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 16125-16130
38. Cheung, A.Y., Wang, H. y Wu, H-M. (1995) *Cell* **82**, 383-393
39. Dong, J., Kim, S. T. y Lord, E. M. (2005) *Plant Physiol.* **138**, 778
40. Hancock, C. N., Kent, L. y McClure, B. (2005) *Plant J.* **43**, 716-723
41. Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C. B., Hancock, C. N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T. E., Cruz-García, F., y McClure, B. (2006) *Nature* **439**, 805-810
42. Lee, C. B., Swatek, K. N. y McClure, B. A. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 26965-26973
43. Lee, C., Kim, S. y McClure, B. (2009) *Plant Phys.* **149**, 791-802
44. Hua, Z. y Kao, T. (2006) *Plant Cell* **18**, 2531- 2553
45. Sims, T. L. y Ordanic, M. (2001) *Plant Mol. Biol.* **47**, 771
46. O'Brien, M., Major, G., Chanta, S. y Matton, D. (2004) *Sex. Plant Reprod.* **17**, 81-87
47. Huang, J., Zhao, L., Yang, Q., y Xue, Y. (2006) *Plant J.* **46**, 780-793
48. Zhou, J., Wang, F., Ma, W., Zhang, Y., Han, B., y Xue, Y. (2003) *Sex. Plant Reprod.* **16**, 165-177.
49. Juárez-Díaz, J., McClure, B., Vazquez-Santana, S., Guevara-García, A., León-Mejía, P., Márquez-Guzmán, J. y Cruz-García, F. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 3418-3424
50. McClure, B., Mou, B., Canevascini, S., y Bernatzky, R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13548-13553
51. Kondo, K., Yamamoto, M., Itahashi, R., Sato, T., Egashira, H., Hattori, T., y Kowyama, Y. (2002) *Plant J.* **30**, 142-153
52. O'Brien, M., Kapfer, C., Mayor, G., Laurin, M., Bertrand, C., Kondo, K., Kowyama Y., y Matton, D. P. (2002) *Plant J.* **32**, 985-996
53. Sassa, H. y Hirano H. (2006) *Mol. Gen. Genet.* **275**, 97-104

54. Puerta, A. R., Ushijima, K., Koba, T. y Sassa, H. (2009) *J. Exp. Bot.* **60**, 1309-1318
55. Kondo, K., y McClure, B. (2008) *Mol. Plant* **8**, 634-644
56. Busot, G., McClure, B., Ibarra-Sánchez, C., Jiménez-Durán, K., Vázquez-Santana S. y Cruz-García, F. (2008) *J. Exp. Bot.* **59**, 3187-3201
57. Luu, D. T., Qin, X., Morse, D., Cappadocia, M. (2000) *Nature* **407**, 649-651
58. Hua, Z. y Kao, T. (2008) *Plant J.* **54**, 1094-1104
59. Meng, X., Hua, Z. Wang, N., Fields, A., Dowd, P., y Kao, T-H. (2009) *Sex. Plant Reprod.* **22**, 263-275

Semblanza del Dr. Felipe Cruz García



El Dr. Felipe Cruz García es Biólogo de la Facultad de Ciencias de la UNAM, Maestro en Ciencias (Fisiología Vegetal) por el Colegio de Posgraduados y Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica) por la Facultad de Química de la UNAM. Posteriormente, realizó una estancia posdoctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Missouri-Columbia, USA. Actualmente, se desempeña como Profesor titular de tiempo completo adscrito al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores

como Investigador Nacional Nivel II y es Nivel C del PRIDE en la UNAM. Sus líneas de investigación se centran en entender los mecanismos genéticos y bioquímicos que les permiten a las plantas evitar la endogamia y así aumentar la diversidad genética en las generaciones subsecuentes. Otra área en la que ha estado involucrado, es la del control molecular de la determinación del sexo en plantas unisexuales.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 79-92. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

MECANISMOS ALTERNATIVOS DE LA ACCIÓN DE NEUROMODULADORES

ALTERNATIVE ACTION MECHANISMS OF NEUROMODULATORS

Jorge Flores-Hernández¹, Oswaldo Torres-Ramírez¹ y Gustavo Lopez-Lopez²

¹Instituto de Fisiología, BUAP; ²Facultad de Ciencias Químicas, BUAP
jorge.flores@correo.buap.mx

Resumen

Los neuromoduladores son sustancias que son liberadas por neuronas para regular la actividad neuronal a nivel sináptico o endócrino. Sus acciones pueden ser mediadas por receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los mecanismos clásicos de acción se han asociado a la activación de proteínas G que a través de su subunidad α interactúa con enzimas productores de segundos mensajeros, como el adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y el inositol trifosfato (IP3), o por acción de las subunidades $\gamma\beta$ interactuando con canales iónicos. Pero, además de estas vías clásicas los GPCRs pueden interactuar con otros GPCRs sensibles al mismo o diferente agonista para regular la función fisiológica. Finalmente, se ha encontrado interacción de neuromoduladores (agonistas de GPCRs) con canales iónicos activados por ligando o voltaje para modular la fisiología celular.

Palabras clave: Neurotransmisores, neuromoduladores, receptores metabotrópicos, GPCR, neuromodulación.

Abstract

Neuromodulators are compounds that are released by neurons to regulate its activity at synaptic and endocrine level. Its actions can be mediated by G protein coupled receptors (GPCR). The classical mechanisms has been associated to the action of the α subunit interacting with enzymes that produce cyclic adenosine monophosphate (cAMP) or inositol triphosphate (IP3), also can be due to the action of $\beta\gamma$ subunits interacting with ionic channels. Moreover the GPCRs can interact with other GPCRs sensitive to the same or different agonist to modulate the physiological function. Finally, it has been found that neuromodulators can interact directly with ionic channels ligand or voltage gated to modulate cell physiology.

Keywords: Neurotransmitters, neuromodulators, metabotropic receptors, GPCR, neuromodulation.

Introducción

La comunicación sináptica ha sido definida por la acción de 2 mecanismos, la transmisión sináptica eléctrica y la transmisión sináptica química. La actividad de tipo eléctrico es generada por la comunicación directa entre células a través de las uniones comunicantes o gap junctions. La comunicación química es definida por las moléculas que son liberadas desde una terminal o proceso neuronal, conocida como presinapsis, y la acción de este agente químico es en la región conocida como post sinapsis, el agente químico o neurotransmisor tiene que atravesar un espacio denominado espacio sináptico. Para poder ser definido como neurotransmisor el agente químico tiene que cumplir con 5 criterios: 1) Ser sintetizado y liberado por neuronas. 2) Debe ser liberado desde terminales nerviosas en una forma químicamente identificable, podrá ser aislado y caracterizado estructuralmente. 3) El neurotransmisor deberá reproducir en la neurona postsináptica los mismos eventos generados por la neurona presináptica. 4) Los efectos producidos por el neurotransmisor deberá ser bloqueado competitivamente por agentes antagonistas químicos específicos. 5) Deberán existir mecanismos activos que terminen con la acción del neurotransmisor liberado, como la acción de enzimas degradadoras específicas o sistemas de transporte que acaben con la acción del neurotransmisor.

Con los anteriores criterios han sido definidas más de 20 moléculas transmisoras. Así, podemos definir como neurotransmisores clásicos como Acetilcolina (ACh), Dopamina (DA), Norepinefrina (NE), Serotonina (5HT), Ácido Gama Amino-Butírico (GABA) y Glutamato (aspartato), Endocannabinoides y neurotransmisores peptídicos como Neurotensina (NT), Endorfinas (END), Substancia P (SP), etc.

La mayoría de estas sustancias pueden cumplir con los 5 criterios para ser definidos como neurotransmisores, excepciones como el óxido nítrico que es un gas y los mecanismos de síntesis y liberación no son a través de vesículas.

Es importante en este momento redefinir el mecanismo de acción de los neurotransmisores. Definimos la acción de un neurotransmisor a través de dos mecanismos básicos, el ionotrópico donde el receptor es, en sí, un canal iónico. Tomando esto en cuenta podemos definir como neurotransmisores al Glutamato, GABA, Acetilcolina, Glicina, Serotonina y Adenosina trifosfato (ATP). Cuando alguno de estos compuestos es liberado al espacio

sináptico, alcanza su receptor induciendo un cambio en su estructura que los lleva de un estado cerrado a un estado abierto, permeable a iones, cuya selectividad se define por aminoácidos localizados en la boca del poro formado por las diferentes subunidades que conforman el canal proteico. Una vez activado por el neurotransmisor, el canal iónico permite el flujo de iones, este proceso pasa posteriormente a un estado desensibilizado, y cuando el neurotransmisor es eliminado del espacio sináptico el canal pasa a un estado cerrado. Este proceso de desensibilización es compartido por la mayoría de ellos, con excepción de un grupo de receptores de glutamato, el que es activado específicamente por kainato. La activación de dicho canal por el kainato o por el glutamato permite el flujo de iones sin pasar al estado desensibilizado y se mantiene abierto hasta que el neurotransmisor o su agonista es eliminado.

El otro mecanismo de acción de los neurotransmisores es el metabotrópico, que en este caso los llamaremos neuromoduladores, en el cual la mayoría de las moléculas neurotransmisoras antes mencionadas pueden ejercer su acción, a través de la activación de receptores, por lo general de la familia de proteínas de membrana con 7 segmentos transmembranales. Esta familia comprende más de 800 proteínas que al ser activadas interactúan con proteínas G y son denominadas como receptores acopladas a proteínas G (GPCRs) [1]. Eliminando las moléculas que activan el sistema del gusto y olfativo, existen más de 100 GPCRs que no se les conoce un agonista endógeno específico y se les considera huérfanos (Orphans) [1, 2]. Con el desarrollo de la Quimiogenómica cuyo propósito es la identificación de pequeñas moléculas que interactúan con los productos del genoma y modulan sus funciones biológicas se ha disparado la investigación para encontrar moléculas que interactúen directamente con los GPCRs [2,3].

Una vez que el receptor es activado, este se acopla a una proteína G (la cual está formada por 3 subunidades α , β y γ) la que a su vez puede actuar sobre enzimas efectoras como la adenilil ciclasa (AC) o la fosfolipasa C (PLC) a través de las subunidades α s o α q respectivamente, o actuando sobre canales iónicos a través de las subunidades $\beta\gamma$. Para una revisión ver [4-6].

Así, podemos poner como ejemplo como el ácido glutámico puede ejercer su acción a través de receptores ionotrópicos, a través de tres familias de receptores, los sensibles a AMPA (ácido α -amino-3- hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropiónico, kainato y a NMDA (ácido N-Metil-D-Aspártico) los cuales permiten el flujo en diferentes proporciones de cationes sodio, calcio y potasio, generando una despolarización de la membrana neuronal. O por la activación de receptores metabotrópicos la activación de proteínas G que a su vez activarán a enzimas efectoras que amplificarán la señal [7].

Cuando un GPCR es activado por su agonista específico, induce un cambio estructural que permite que la subunidad α de la proteína G asociada pueda separar al GDP que normalmente mantiene unido y en estado desactivado, y posteriormente pueda asociarse a GTP quedando en estado activado, permitiendo a su vez activar o inactivar las enzimas efectoras como adenilil ciclasa o la fosfolipasa C (Ver Figura 1). La subunidad α tiene actividad GTPasa, mientras la subunidad α tenga el GTP estará en condición de activar a la proteína efectora. Cuando la subunidad α , por su actividad de GTPasa o fosfodiesterasa, desfosforile al GTP convirtiéndolo en GDP y liberando un fosfato inorgánico, esta subunidad α pasará a un estado desactivado y perdiendo la capacidad de activar a la proteína efectora [4]. La Figura 1 muestra esta cascada de señalización utilizando el ejemplo de la activación de la $G_{\alpha s}$ que activa a la adenilil ciclasa produciendo AMPc (adenosina monofosfato cíclico). El AMPc se une a las subunidades reguladoras de la proteína cinasa A que tiene la capacidad de fosforilar en residuos aminoácidos de serina o treonina.

Otro de los mecanismos considerados como clásicos es la activación de la fosfolipasa C. Esta enzima tiene la función de romper los fosfolípidos de membrana, y en este caso la forma C rompe específicamente la unión entre el fosfato que sirve de puente con el inositol difosfato, al

romper a este nivel el inositol queda libre con 3 fosfatos, por lo cual se denomina inositol trifosfato (Ver Figuras 2 y 3).

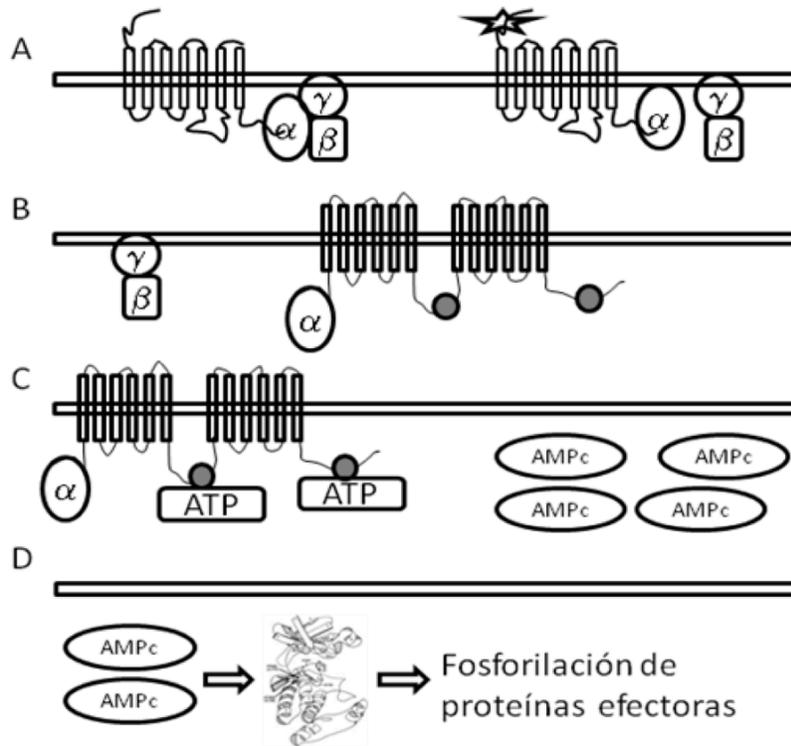


Figura 1. Vía de señalización de la PKA. A. GPCR asociada a una proteína G. Cuando el neuromodulador activa a la GPCR la proteína G se separa dejando activa la subunidad α . B. La subunidad α puede activar a la adenilil ciclasa. C La Adenilil ciclasa a partir de ATP genera AMPc. D. El AMPc producido por esta cascada activa a la PKA la cual a su vez fosforila proteínas efectoras.

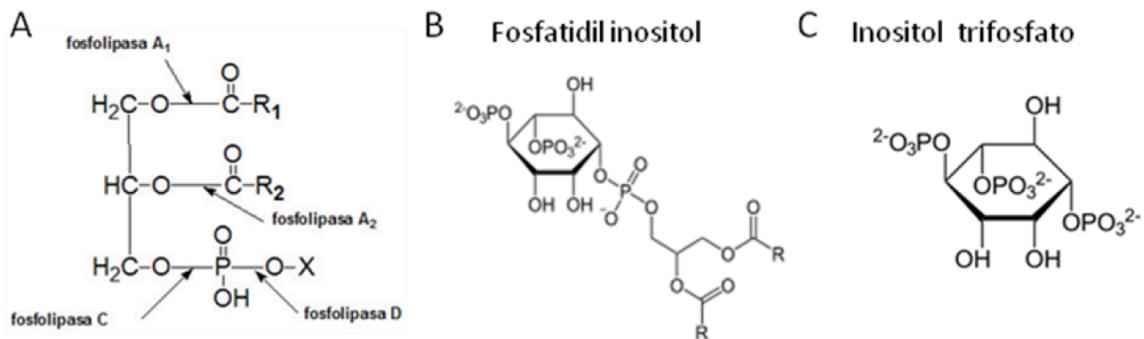


Figura 2. Inositol trifosfato y la Fosfolipasa C. A. Sitios de acción de las fosfolipasas A1, A2, C y D. B. Estructura del fosfatidil inositol. C. Inositol trifosfato.

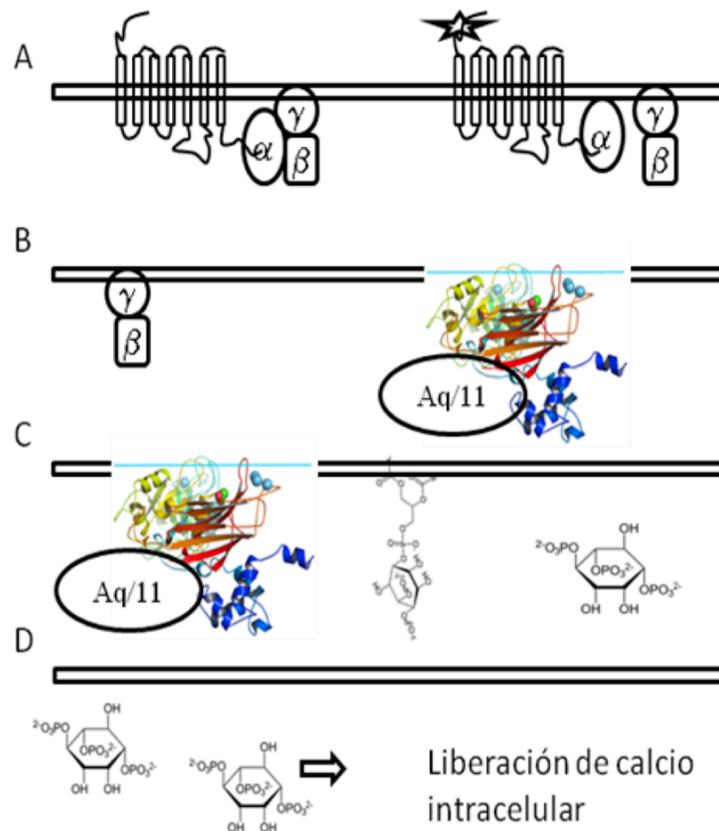


Figura 3. Vía de señalización de la fosfolipasa C- inositol trifosfato . A. GPCR asociada a una proteína G. Cuando el neuromodulador activa a la GPCR la proteína G se separa dejando activa la subunidad α . B. La subunidad α puede activar a la fosfolipasa C (PLC). C. La PLC a partir de fosfatidilinositol de membrana genera inositol trifosfato (IP3). D. El IP3 producido por esta cascada activa a la liberación de calcio desde reservorios intracelulares.

Un proceso intermedio de activación a través de las proteínas G es el mediado por la interacción de las subunidades $\beta\gamma$ que quedan libres al separarse de la subunidad α . Se ha reportado la acción de los dímeros $\beta\gamma$ sobre los canales de potasio rectificadores entrantes (GIRKs o Kir3.x) [8,9] además se ha mostrado que los dímeros conformados por las subunidades $\beta 1$ - $\beta 4$ activan el canal mientras que aquellos conformados por la subunidad $\beta 5$ actúan como competidores inhibiendo dicha activación [10]. Cuando se estimula con toxina pertusis (PTx) se activa irreversiblemente las proteínas Gai/o separando la subunidad alfa del dímero $\beta\gamma$ permitiendo al unión con el canal GIRK y activándolo [8,10-12]. También se ha mostrado que la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5HT) incrementa la conductancia de los canales GIRK a través de este mecanismo, mientras que el uso de la hormona liberadora de tirotropina hace lo opuesto [9]. Además, se ha observado que estos dímeros G $\beta\gamma$ pueden activar a la PLC [13]. Un ejemplo de esta interacción es la corriente activada, o con canales de calcio sensibles a voltaje del tipo P/Q o N, con algunas isoformas de adenilato ciclasa o fosfolipasa C, así como con algunas isoformas de la fosfoinositido 3 cinasa (PI-3K) [14].

Si seguimos el modelo clásico de acción de las proteínas G es posible a través del uso de bloqueadores específicos demostrar que la activación de una GPCR lleva a cabo una determinada cascada de señalización. Por ejemplo, si suponemos que la activación de una GPCR activa a la adenilato ciclasa este efecto deberá ser mimetizado por el uso de forskolina la

cual activa directamente a la adenilil ciclasa. Si queremos eliminar el papel de las proteínas G se pueden dejar activadas de manera saturante al usar GTPγS que activaría de manera irreversible a la subunidad A y por tanto la acción del agonista al activar el GPCR se vería ocluido. Con el mismo objetivo se pueden utilizar agonistas permeables a la membrana para activar o bloquear la activación de la PKA. Si después de bloquear las diferentes fases de la cascada de señalización y el efecto final en estudio se mantiene, probablemente tengamos un mecanismo de neuromodulación alternativo de las vías de señalización clásicas. Mecanismo de modulación dopaminérgica clásica.

Las acciones de dopamina son mediadas por la activación de múltiples vías de transducción de señales por segundos mensajeros. El receptor D1 clásico es conocido por estar acoplado al sistema de adenilato ciclasa (AC) [15,16]. Incrementos subsecuentes en la formación de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), conllevan a la activación de la proteína cinasa A (PKA), desatando una cascada de eventos bioquímicos. Sin embargo, en adición a esta vía clásica del receptor D1 se ha encontrado que también está acoplado a la fosfolipasa C (PLC), esto se deduce a partir del hallazgo de ARNm en estriado de rata que codifica a estos receptores [17]. En tejido cerebral y renal de rata, la activación del receptor D1 clásico acoplado a PLC, incrementa la formación del inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) [18,19]. Este resultado no es dependiente de AMPc, ya que incrementa el calcio intracelular (por el IP) y la activación de la proteína Cinasa C (PKC) por la activación del diacilglicerol (DAG). En ratones modificados genéticamente para no expresar el receptor subtipo D1a, hay una expresión continua del receptor D1 acoplado a PLC pero no del receptor D1 acoplado a AC sugiriendo que estos dos tipos de receptores tienen una expresión genética diferente. Mientras que en la amígdala, la estimulación de los receptores D1 inducen un incremento en la formación de IP3 pero no del AMPc, en corteza frontal y estriado se activan ambos sistemas de transducción de señales [20], lo cual nos lleva a deducir que también existe una distribución regional de estos dos sistemas que están acoplados al receptor D1.

Modulación de receptores de DA sobre corrientes iónicas

Las neuronas de la corteza prefrontal (CPF) reciben entradas que evocan potenciales excitatorios postsinápticos (excitatory postsynaptic potentials, EPSP) subumbrales para disparar en ráfaga. Estos PEPS, de origen glutamatérgico, se activan en un voltaje de 10-30mV más positivo que el potencial de membrana en reposo, al cual corrientes iónicas dependientes de voltaje, como la corriente persistente de sodio (INaP), corriente persistente de potasio (IKP), corriente de bajo umbral de calcio, se activan e interactúan unas con otras para regular el umbral de disparo, así como la duración y la amplitud de los EPSPs [21,22].

Diversos estudios han mostrado el efecto de la dopamina directamente sobre las principales corrientes iónicas que subyacen a la iniciación de disparo. La estimulación de los receptores de DA postsinápticos D1/D5 y D2/D3 puede modular los cambios temporales en las conductancias iónicas que alteran el umbral de disparo en neuronas de CPF medial (CPFm). En respuesta a entradas despolarizantes, la activación de receptores D2/D3 puede inducir un decremento temprano de la excitabilidad neuronal, mientras que la activación de D1/D5 induce un prolongado aumento de la excitabilidad neuronal [23]. Este efecto bifásico de la dopamina puede verse temporalmente después de la aplicación, produciendo inicialmente un decremento en las medidas fisiológicas seguida de un decremento de estas. Diversos estudios en regiones cerebrales como hipocampo, estriado y corteza prefrontal y en tejidos no cerebrales demuestran acciones bifásicas de la dopamina haciendo este efecto una característica principal de este neuromodulador.

En el caso de la INaP, los resultados no han sido claros aún. Mediante la técnica de voltaje-clamp, usando un electrodo de registro intracelular, en rebanada en neuronas de CPF de rata, activando una corriente lenta de entrada sensible a TTX (en ausencia de bloqueadores de

canales iónicos para calcio y potasio) mediante una rampa de voltaje, se encontró que esta corriente se suprimió por la administración en el baño de DA 10 μ M [24], mientras que otros estudios reportaron que la DA no produce modulación de la INaP en neuronas corticales.

Por otra parte, Cepeda y colaboradores [25] examinaron los efectos sobre la corriente de entrada evocadas por rampas de voltaje despolarizantes, en rebanadas de corteza provenientes de la cirugía de niños con epilepsia y encontró que la DA en concentraciones de 20-50 μ M produce una reducción de la INaP, sin verse afectado la amplitud de esta corriente.

La modulación de la cinética de activación e inactivación de la INaP por DA podría deberse a una misma modulación por DA sobre otras corrientes que aumentarían la diferencia de voltaje entre los compartimentos, por lo que se tendría un amplio rango de cambios en la integración de señales neuronales. Los efectos inducidos por la DA sobre la INaP, pueden mejorar la probabilidad de que las neuronas, en ciertas regiones cerebrales como la CPFm, inicien el disparo de espigas en un tiempo dado, en respuesta a una despolarización subumbral de entrada, así la frecuencia específica de disparo puede ser transmitida a neuronas vecinas interconectadas [26, 27] lo cual puede conllevar a una oscilación subumbral en la misma frecuencia y fase.

La modulación de los canales de sodio en cerebro de mamíferos puede ser atribuido a la fosforilación de canales vía activación de la PKA dependiente de AMPc, así como por la proteína cinasa C (PKC) dependiente de calcio. La activación de la PKA reduce la amplitud al pico de la corriente rápida de sodio, sin afectar la cinética o las propiedades dependientes de voltaje de los canales de sodio [28-30]. Registros de canal unitario en neurona de hipocampo y estriado muestran que la DA, a través de la activación de la PKA pero no de la PKC, reduce la probabilidad de apertura de los canales de sodio que conducen la corriente transitoria rápida de sodio [31, 32]. Estudios han mostrado que la modulación de esta corriente por la vía D1/PKA es dependiente de voltaje con efectos no vistos a -110mV, pero existe un efecto supresor de la corriente que va aumentando progresivamente a medida que el potencial de membrana se va despolarizando. Debido a que la estimulación de PCA induce un pequeño cambio en la dependencia de voltaje en la inactivación del estado estacionario de la corriente de sodio, se sugiere que voltaje de membrana puede alterar directamente el patrón de fosforilación de la PKA [33, 34]. En contraste, la activación de la PKC no sólo modula la amplitud del pico de la corriente transitoria rápida de sodio, sino también hace más lenta su inactivación.

En neuronas piramidales de la corteza prefrontal media (CPFm) la despolarización del subumbral de membrana por corrientes entrantes es conocida por ser opuesta a la inactivación lenta de la corriente (conductancia) de salida del potasio. La corriente de inactivación lenta de potasio (IKIL), la cual opera en los rangos subumbrales para el inicio de disparos de espiga, es sensible a la 4-aminopiridina y dendrotoxina. Esta corriente lenta de salida media la rectificación de salida de membrana en el rango de voltaje despolarizada y es funcionalmente opuesta a la despolarización sostenida por la corriente lenta de sodio (INaP). Cuando los canales de sodio y calcio son bloqueados, los agonistas de D1/D5 pueden remover la rectificación de salida de membrana mediada por la corriente de inactivación lenta de potasio y esto permite que la INaP ejerza su efecto primario: bajar el umbral para el disparo de espiga [21]. Estudios realizados en neuronas disociadas de estriado demuestran que la estimulación del receptor D1 por el agonista APB (0.01-100 μ M) y SKF 38393 (10 μ M) reduce selectivamente la corriente de inactivación lenta de potasio de forma dependiente de la dosis [35]. Este efecto se encontró que no fue mediado por receptores D1 clásicos acoplados al sistema de adenilato ciclasa, por lo que los autores propusieron una regulación de tipo alostérico o un bloqueo de los canales que producen esta corriente, en otras palabras, existe una interacción directa. Sin embargo, en neuronas disociadas de CPF, la reducción de la IKIL por los receptores D1 es provocada por la vía intracelular D1-AMPc-PKA [36, 37]. La consecuencia de estos eventos es que una vez que el umbral para el disparo de espigas haya disminuido por la DA, el disparo repetitivo siguiente podría ser sostenido.

Este mecanismo clásico de acción se reportó para la modulación de las corrientes activadas por NMDA o por GABA en las neuronas neocorticales de rata [38, 39] o en corteza prefrontal [40]. La vía de señalización inicia con la activación de los receptores de dopamina de la familia D1, que a través de la interacción proteínas G α s, activan a la adenilil ciclasa (AC) generando AMPc, y posteriormente activar a la PKA la cual fosforila el receptor de NMDA. Esta acción es favorecida por la fosforilación de la proteína activada por dopamina y AMPc de 32 Kd (DARPP32) [41], la cual al ser fosforilada es un potente inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (PP1) cuya función es eliminar los fosfatos de proteínas fosforiladas regresándolas a su estado funcional basal.

En el caso de la modulación mediada por dopamina de las corrientes GABAérgicas, se reportó que la fosforilación de la subunidad β 3 en las serinas S408 y S409 incrementó las corrientes iónicas registradas, mientras la mutación selectiva de S408 por alanina convirtió la potenciación en inhibición, lo cual es comparable a la sola fosforilación del sitio S408 en la subunidad β 1 [42].

Otro mecanismo a través del cual la DA podría cambiar la excitabilidad neuronal es vía modulación de corrientes de calcio (ICa). Se sabe que la conductancia iónica activa (Na $^{+}$, K $^{+}$, Ca $^{2+}$) está presente en las dendritas y en las propiedades biofísicas de las dendritas apicales en neuronas de CPF, corteza somatosensorial e hipocampo. Varios subtipos de canales de calcio están presentes a lo largo de las dendritas apicales y basales, implicados no solo en la regulación de disparo sino también en la amplificación de la señal sináptica y la plasticidad sináptica dependiente de calcio [43, 44]. La cercanía de las terminales dopaminérgicas mesocorticales sobre las espinas que se encuentran en las dendritas apicales y basales sugieren una modulación dopaminérgica directa sobre los canales de calcio, y esto quizás después de la supresión de la IKIL lo cual tendría una gran influencia sobre las entradas y salidas sinápticas de neuronas de CPF [45].

Otro efecto de los receptores de dopamina el cual es poco conocido, es la activación de metil-transferasas para metilar fosfolípidos. En este proceso la dopamina a través de los receptores D4 interactúa con metil transferasas para metilar a la fosfatidiletanolamina membranal y convertirla en fosfatidilcolina, lo cual incrementando la fluidez de la membrana en la vecindad del receptor de dopamina D4 [46-50].

Interacción proteína-proteína (GPCR-GPCR)

La interacción de los GPCR con los sistemas de señalización citoplasmáticos no es la única forma de interacción de las proteínas acopladas a proteínas G (GPCRs). Las GPCRs interactúan directamente, a través de una interacción proteína-proteína formando heterodímeros. Ya cada vez es mayor la lista de receptores que forman heterómeros [1].

Inicialmente, con las técnicas de co-inmunoprecipitación encontraron interacciones entre receptores de adenosina como la interacción A1/A2A que fue confirmada por detección de inmuno-oro (immunogold) y con co-inmunoprecipitación en terminales glutamatérgicas en el estriado de la rata [51]. Asimismo, en 2001 Ciruela y colaboradores [52] reportan interacciones entre el receptor de glutamato metabotrópico 1 α (mGlu1 α) y el receptor A1 en sinaptosomas cerebelares. Se han reportado interacción ente A2/D2 [53, 54], entre A2/mGlu5 [55], entre D1-D2/H3 [56], entre otros.

Con el desarrollo de la tecnología FRET (transferencia de energía fluorescente resonante por cercanía) y BRET (transferencia de biofluorescencia resonante por cercanía) se han encontrado interacciones funcionales entre moléculas cuya cercanía es del rango de 1-10 nanómetros, así una gran cantidad de receptores metabotrópicos formadores de dímeros han

sido identificados, para una revisión ver [1, 57-59]. En una revisión Kamal y Jockers [1] muestran ejemplos de interacciones diméricas entre receptores adrenérgicos con opioides, serotonina con dopamina, galanina glutamato metabotrópicos. Con estos datos podemos observar que el proceso metabotrópico de un receptor puede ser a su vez regulado por la interacción con otro receptor a un neuromodulador diferente, o incluso por el mismo. Así se han descrito acciones de los dímeros en los sistemas neuroendocrino, nervioso central, cardiovascular, renal, gustativo y en el metabolismo.

Interacción de receptores de dopamina (GPCR) con receptores ionotrópicos de Glutamato

Un ejemplo interesante es el papel regulador de la dopamina sobre corrientes iónicas activadas por glutamato. En 2002 mostramos que la dopamina modula positivamente las corrientes activadas por NMDA [60], este proceso es llevado a cabo por los receptores de dopamina tipo I a través del mecanismo clásico, la activación de una proteína Gas la cual induce la activación de la adenilciclasa para, a su vez, producir AMPc. El AMPc producido se une a las subunidades reguladores de la Proteína Cinasa A (PKA) dejando libres las subunidades catalíticas que al fosforilar el receptor de NMDA favorece una mayor conductancia. A través de este proceso clásico mediado por la dopamina ingresaría mayor cantidad de iones calcio al interior celular, lo cual puede llegar a ser dañino a la célula. Sabemos que el calcio al no ser manejado adecuadamente por la célula puede disparar el proceso de apoptosis celular [61, 62]. Ahora bien, imaginemos la condición en donde la entrada de calcio compromete la viabilidad neuronal, si esta entrada de calcio es potenciada por dopamina en un proceso funcional y necesario, esta acción aumentaría el riesgo de apoptosis. Lee y colaboradores describieron un mecanismo por el cual la dopamina puede interactuar con la porción intracelular del receptor de NMDA y a su vez activar un proceso intracelular que inhiba la activación de la apoptosis [63]. En este trabajo describen como la activación del receptor de dopamina (DA1), a través de una interacción intracelular directa de proteína a proteína, se induce la activación la fosfoinosítido 3 cinasa (PI3K) que protege a la neurona de un posible daño apoptótico.

En este mismo sentido de interacción heteromérica GPCR-canal iónico, Liu y colaboradores publicaron la interacción directa proteína-proteína (cross-talk) entre el receptor de dopamina (D5) y el receptor de GABAA [64]. En este trabajo muestran que la coactivación de los receptores de GABA ($\gamma 2$) y Dopamina (D5-CT) produce una reducción en la producción de AMPc y a la vez una reducción de la corriente generada por GABA. Aunque aún no había sido comprobado por las técnicas de FRET o BRET, este trabajo se centró en la formación de quimeras entre las secciones terminales citoplásmicas de las subunidades $\gamma 2$ del receptor de GABA y la región carboxilo terminal del receptor de dopamina D5.

Interacción directa de un neuromodulador con un receptor ionotrópico

En el tiempo en que se demostraba que la dopamina modulaba las corrientes activadas por NMDA en neuronas neocorticales a través de las cascadas de señalización clásicas asociadas a proteínas G y efectores como la proteína Cinasa A (PKA), también empezaron a ser reportados trabajos donde los efectos producidos por agonistas específicos al receptor de dopamina tipo 1 no podían ser antagonizados por los agentes específicos. En 1999, Castro y colaboradores reportaron que la dopamina y su agonista D1 el (+)-SKF38393 inhiben las corrientes activadas por NMDA de una manera voltaje dependiente y este efecto no pudo ser antagonizado por R(+)-SCH23390, un antagonista específico D1 [65]. Asimismo, más recientemente, en 2006 Cui y colaboradores reportan acciones de la dopamina sobre las corrientes activadas por NMDA en células HEK (Human Embryonic Kidney, riñón embrionario humano) [66]. En estas células se expresaron las subunidades NR1A y NR2A para generar las corrientes iónicas, sin embargo no se expresó ningún mensajero para receptores de dopamina.

En estas condiciones la dopamina y los agonistas o antagonistas de la familia D1 inhibieron de manera concentración y voltaje dependiente.

Estos datos nos muestran que en ciertas condiciones, los neuromoduladores, como en este caso la dopamina pueden interactuar directamente con un receptor ionotrópico. Si consideramos la complejidad estructural extracelular de los receptores NMDA y que moléculas conocidas como la ketamina, fenciclidina (PCP), poliaminas, y algunos iones divalentes como el zinc y magnesio, que se unen regulando alostéricamente la acción del canal, por lo tanto podemos suponer que otras moléculas puedan interactuar de esta forma neuromodulando canales iónicos (Figura 4).

Interacción de la Acetilcolina con receptores NMDA

Como otro ejemplo de la interacción de un neuromodulador a un receptor ionotrópico, es la interacción de la acetilcolina con receptores NMDA. Durante el estudio del efecto de la acetilcolina sobre las corrientes activadas por NMDA encontraron otras acciones neuromoduladoras de la acetilcolina que no pueden ser explicadas por la acción clásica, a través de los receptores metabotrópicos [67]. En este estudio la propuesta inicial fue analizar el efecto de la acetilcolina que es generada en las neuronas gigantes del neocórtex, ya se había demostrado que la acetilcolina no generaba corrientes de tipo nicotínico, por lo cual la única posible acción de la acetilcolina sería la de los receptores metabotrópicos muscarínicos. Encontramos que la acetilcolina o su agonista muscarínico, la oxotremorina-M (OXO) inhiben la corriente inducida por NMDA en neuronas neocorticales, sin embargo este efecto no era eliminado por el antagonista muscarínico clásico, la atropina, e incluso en presencia de esta última se potenciaba el efecto inhibitorio de acetilcolina u OXO. En estudios realizados en rebanadas de neocórtex, encontraron que la fisostigmina (inhibidor de la acetilcolinesterasa) al evitar la degradación de la acetilcolina liberada espontáneamente en la rebanada era suficiente para inhibir las corrientes de glutamato (tipo NMDA). En otra serie de experimentos, y con el objetivo de descartar acciones de tipo nicotínico que interactuaran con las acciones del glutamato (NMDA), se probó la nicotina, así encontramos que la nicotina y el antagonista específico de los receptores nicotínicos, la d-tubocurarina, disminuyen las corrientes activadas de tipo NMDA en rebanadas y en células disociadas [39].

Comentario final

Como hemos revisado, los neuromoduladores pueden ejercer sus acciones por varias vías, las más comunes y primeramente descritas son las asociadas a la unión a las GPCR y activación de proteínas G y activación de enzimas efectoras que producirían cambios en los parámetros fisiológicos estudiados. Además, interacciones GPCR-GPCR para regulación de las vías de señalización involucradas, interacciones entre GPCR y receptores ionotrópicos, y finalmente interacción de neuromoduladores con receptores ionotrópicos.

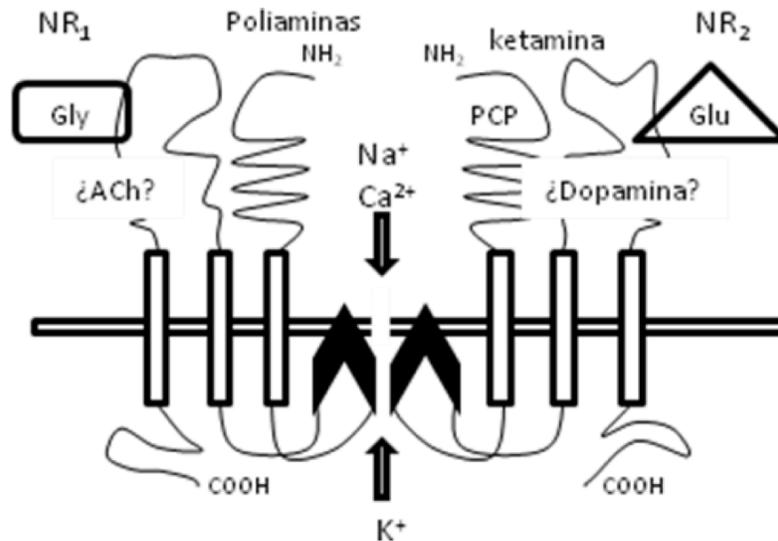


Figura 4. Receptor de NMDA. El receptor de NMDA es pentamérico formado por principalmente subunidades NR1 y NR2. En el esquema se muestran sitios de unión a Glicina (Gly) en la subunidad NR1 y Glutamato (Glu) en la subunidad NR2, además sitio de unión a fenciclidina (PCP), ketamina, poliaminas, etc. Agregamos la posible unión de acetilcolina (ACh) y de dopamina con las regiones extracelulares del receptor de NMDA.

Referencias

- Kamal, M.J. y Ralf, R. (2011) *Frontiers in Endocrinology* **2**, 13
- Weill, N. (2011) *Curr. Top. Med. Chem.*
- Renner, S., Popov, M., Schuffenhauer, A., Roth, H.J., Breitenstein, W., Marzinzik, A., Lewis, I., Krastel, P., Nigsch, F., Jenkins, J. y Jacoby, E. (2011) *Future Med. Chem.* **3**, 751-766
- Gilman, A.G. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615-649
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K. y Clapham, D.E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29059-29062
- Linder, M.E. y Gilman, A.G. (1992) *Sci. Am.* **267**, 56-61, 64-55
- Pin, J.P. y Duvoisin, R. (1995) *Neuropharmacology* **34**, 1-26
- Luchian, T., Dascal, N., Dessauer, C., Platzter, D., Davidson, N., Lester, H.A. y Schreibley, W. (1997) *J. Physiol.* **505**, (Pt 1) 13-22
- Lei, Q., Jones, M.B., Talley, E.M., Garrison, J.C. y Bayliss, D.A. (2003) *Mol. Cells.* **15**, 1-9
- Wickman, K. y Clapham, D.E. (1995) *Physiol. Rev.* **75**, 865-885
- Clapham, D.E. y Neer, E.J. (1997) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 167-203
- Wickman, K.D. y Clapham, D.E. (1995) *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 278-285
- Buck, E., Li, J., Chen, Y., Weng, G., Scarlata, S. y Iyengar, R. (1999) *Science* **283**, 1332-1335
- Zhou, J.Y., Siderovski, D.P. y Miller, R.J. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 7143-7148
- Kebabian, J.W., Petzold, G.L. y Greengard, P. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2145-2149
- Kebabian, J.W. y Calne, D.B. (1979) *Nature* **277**, 93-96
- Mahan, L.C., Burch, R.M., Monsma, F.J.Jr. y Sibley, D.R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2196-2200
- Undie, A.S. y Friedman, E. (1990) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 987-992
- Undie, A.S., Weinstock, J., Sarau, H.M. y Friedman, E. (1994) *J. Neurochem.* **62**, 2045-2048
- Friedman, E., Jin, L.Q., Cai, G.P., Hollon, T.R., Drago, J., Sibley, D.R. y Wang, H.Y. (1997) *Mol. Pharmacol.* **51**, 6-11

21. Yang, C.R. y Seamans, J.K. (1996) *J. Neurosci.* **16**, 1922-1935
22. Yang, C.R., Seamans, J.K. y Gorelova, N. (1996) *J. Neurosci.* **16**, 1904-1921
23. Gorelova, N.A. y Yang, C.R. (2000) *J. Neurophysiol.* **84**, 75-87
24. Geijo-Barrientos, E. y Pastore, C. (1995) *Eur. J. Neurosci.* **7**, 358-366
25. Cepeda, C., Chandler, S.H., Shumate, L.W. y Levine, M.S. (1995) *J. Neurophysiol.* **74**, 1343-1348
26. Kritzer, M.F. y Goldman-Rakic, P.S. (1995) *J. Comp. Neurol.* **359**, 131-143
27. Levitt, J.B., Lewis, D.A., Yoshioka, T. y Lund, J.S. (1993) *J. Comp. Neurol.* **338**, 360-376
28. Smith, R.D. y Goldin, A.L. (1997) *J. Neurosci.* **17**, 6086-6093
29. Numann, R., Catterall, W.A. y Scheuer, T. (1991) *Science* **254**, 115-118
30. West, J.W., Numann, R., Murphy, B.J., Scheuer, T. y Catterall, W.A. (1991) *Science* **254**, 866-868
31. Cantrell, A.R., Smith, R.D., Goldin, A.L., Scheuer, T. y Catterall, W.A. (1997) *J. Neurosci.* **17**, 7330-7338
32. Schiffmann, S.N., Lledo, P.M. y Vincent, J.D. (1995) *J. Physiol.* **483**, 95-107
33. Cantrell, A.R., Scheuer, T. y Catterall, W.A. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 5301-5310
34. Cantrell, A.R., Tibbs, V.C., Westenbroek, R.E., Scheuer, T. y Catterall, W.A. (1999) *J. Neurosci.* **19**, RC21
35. Nisenbaum, E.S., Mermelstein, P.G., Wilson, C.J. y Surmeier, D.J. (1998) *Synapse* **29**, 213-224
36. Choi, J.Y., Kim, H., Choi, Y.J., Ishihara, A., Back, K. y Lee, S.G. (2010) *Fitoterapia* **81**, 1134-41
37. Dong, Y. y White, F.J. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 2686-2695
38. Flores-Hernandez, J., Cepeda, C., Hernandez-Echeagaray, E., Calvert, C.R., Jokel, E.S., Fienberg, A.A., Greengard, P. y Levine, M.S. (2002) *J. Neurophysiol.* **88**, 3010-3020
39. Flores-Hernandez, J., Hernandez, S., Snyder, G.L., Yan, Z., Fienberg, A.A., Moss, S.J., Greengard, P. y Surmeier, D.J. (2000) *J. Neurophysiol.* **83**, 2996-3004
40. Chen, G., Greengard, P. y Yan, Z. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2596-2600
41. Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.A., Nairn, A.C. y Greengard, P. (2004) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 269-296
42. McDonald, B.J., Amato, A., Connolly, C.N., Benke, D., Moss, S.J. y Smart, T.G. (1998) *Nat. Neurosci.* **1**, 23-28
43. Magee, J.C. y Johnston, D. (1997) *Science* **275**, 209-213
44. Markram, H., Lubke, J., Frotscher, M. y Sakmann, B. (1997) *Science* **275**, 213-215
45. Yang, C.R., Seamans, J.K. y Gorelova, N. (1999) *Neuropsychopharmacology* **21**, 161-194
46. Deth, R., Muratore, C., Benzecry, J., Power-Charnitsky, V.A. y Waly, M. (2008) *Neurotoxicology* **29**, 190-201
47. Kuznetsova, A.Y. y Deth, R.C. (2008) *J. Comput. Neurosci.* **24**, 314-329
48. Sharma, A., Kramer, M.L., Wick, P.F., Liu, D., Chari, S., Shim, S., Tan, W., Ouellette, D., Nagata, M., DuRand, C.J., Kotb, M. y Deth, R.C. (1999) *Mol. Psychiatry* **4**, 235-246
49. Sharma, A., Waly, M. y Deth, R.C. (2001) *Eur. J. Pharmacol.* **427**, 83-90
50. Zhao, R., Chen, Y., Tan, W., Waly, M., Sharma, A., Stover, P., Rosowsky, A., Malewicz, B., Deth, R.C. (2001) *J. Neurochem.* **78**, 788-796
51. Ciruela, F., Casado, V., Rodrigues, R.J., Lujan, R., Burgueno, J., Canals, M., Borycz, J., Rebola, N., Goldberg, S.R., Mallol, J., Cortes, A., Canela, E.I., Lopez-Gimenez, J.F., Milligan, G., Lluís, C., Cunha, R.A., Ferre, S. y Franco, R. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 2080-2087
52. Ciruela, F., Escriche, M., Burgueno, J., Angulo, E., Casado, V., Soloviev, M.M., Canela, E.I., Mallol, J., Chan, W.Y., Lluís, C., McIlhinney, R.A. y Franco, R. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 18345-18351
53. Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S.R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L.F., Woods, A.S., Ferre, S., Lluís, C., Bouvier, M. y Franco, R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 46741-46749
54. Tanganelli, S., Sandager, T., Nielsen, K., Ferraro, L., Antonelli, T., Kehr, J., Franco, R., Ferre, S., Agnati, L.F., Fuxe, K. y Scheel-Kruger, J. (2004) *Parkinsonism Relat. Disord.* **10**, 273-280
55. Ferre, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B.T., Popoli, P., Burgueno, J., Gutierrez, M.A., Casado,

- V., Fuxe, K., Goldberg, S.R., Lluís, C., Franco, R. y Ciruela, F. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11940-11945
56. Ferrada, C., Ferre, S., Casado, V., Cortes, A., Justinova, Z., Barnes, C., Canela, E.I., Goldberg, S.R., Leurs, R., Lluís, C. y Franco, R. (2008) *Neuropharmacology* **55**, 190-197
57. Kamal, F.A., Smrcka, A.V. y Blaxall, B.C. (2011) *J. Mol. Cell. Cardiol.*
58. Kocan, M. y Pflieger, K.D. (2009) *Methods Mol. Biol.* **552**, 305-317
59. Kocan, M., See, H.B., Seeber, R.M., Eidne, K.A. y Pflieger, K.D. (2008) *J. Biomol. Screen* **13**, 888-898
60. Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernandez-Echeagaray, E., Calvert, C.R., Jokel, E.S., Fienberg, A.A., Greengard, P. y Levine, M.S. (2002) *J. Neurophysiol.* **88**, 3010-3020
61. Ludwig-Galezowska, A.H., Flanagan, L., Rehm, M. (2001) *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 1044-53
62. Orrenius, S., Nicotera, P. y Zhivotovsky, B. (2011) *Toxicol. Sci.* **119**, 3-19
63. Lee, F.J., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chery, N., Wang, Y., Wang, Y.T., Niznik, H.B., Yu, X.M. y Liu, F. (2002) *Cell* **111**, 219-230
64. Liu, F., Wan, Q., Pristupa, Z.B., Yu, X.M., Wang, Y.T. y Niznik, H.B. (2000) *Nature* **403**, 274-280
65. Castro, N.G., de Mello, M.C., de Mello, F.G. y Aracava, Y. (1999) *Br. J. Pharmacol.* **126**, 1847-1855
66. Cui, C., Xu, M. y Atzori, M. (2006) *Mol. Pharmacol.* **70**, 1761-1770
67. Flores-Hernandez, J., Salgado, H., De La Rosa, V., Avila-Ruiz, T., Torres-Ramirez, O., Lopez-Lopez, G. y Atzori, M. (2009) *Synapse* **63**, 308-318

Semblanza del Dr. Jorge Flores-Hernández



El Doctor Jorge Luis Valente Flores Hernández egresó de la Facultad de Ciencias como Biólogo en 1987. Posteriormente realizó sus estudios de Maestría y Doctorado en Investigación Biomédica Básica en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en 1991 y 1995 respectivamente. En el periodo de 1996 a 2001 el Dr. Flores-Hernández realizó dos estancias postdoctorales una en la Universidad de Tennessee (Memphis, USA) y otra en la Universidad de California (Los Ángeles, USA). Durante ese tiempo, estudió los mecanismos neuromoduladores de la

dopamina sobre corrientes iónicas activadas por NMDA y GABA, así como la fisiología de neuronas humanas obtenidas de tejido displásico de infantes con epilepsia intratable. A partir de 2001 ingresó a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla para dirigir el laboratorio de Neuromodulación. Desde entonces, el Dr. Flores-Hernández se ha dedicado al estudio de los mecanismos neuromoduladores de las corrientes iónicas activadas por voltaje o por ligando, por la acción de neuromoduladores.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 93-106. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

INVESTIGACIONES SOBRE EL CICLO BIOLÓGICO Y LA TRANSMISIÓN DE PNEUMOCYSTIS (FUNGI: ASCOMYCOTA)

RESEARCH ON THE LIFE CYCLE AND TRANSMISSION OF PNEUMOCYSTIS (FUNGI: ASCOMYCOTA)

Eduardo Dei-Cas^{1,2}, Ana Martínez^{2,3}, Magali Chabé^{2,3}, El Moukhtar Aliouat^{2,3},
Christine Demanche^{2,3} y Cécile-Marie Aliouat^{2,3}

¹Servicio de Parasitología-Micología, Facultad de Medicina (USDL), CHRU Lille, Univ. Lille Nord de France, 59037 Lille, France; ²INSERM U1019, CNRS UMR8204, Instituto Pasteur de Lille, 59019 Lille, France; ³Laboratorio de Parasitología-Micología, Facultad de Ciencias Farmacéuticas (USDL), Univ. Lille Nord de France, 59037 Lille, France
eduardo.dei-cas@pasteur-lille.fr

Resumen

El hábitat de las especies de Pneumocystis es el alvéolo pulmonar de los mamíferos, donde las formas tróficas de este organismo eucariota, difícilmente cultivables, se adhieren específicamente a las células epiteliales alveolares de tipo 1 utilizando prolongaciones citoplásmicas (filópodos). En general se acepta que las formas tróficas (2-8 µm), ameboides, mononucleadas, con pared celular fina, se transforman en esporocitos redondeados (3-6 µm) y luego en quistes (o ascos) (4-6 µm) con pared celular espesa, los cuales, cuando maduran, contienen ocho esporas (ascoesporas). Estas abandonan el quiste por un orificio preformado iniciando una nueva generación de formas tróficas. El contenido en ADN de los diversos estadios parasitarios fue determinado recientemente empleando métodos citométricos de alto rendimiento para separarlos. Los mismos métodos están siendo usados para explorar las potencialidades evolutivas de cada estadio in vivo e in vitro.

Los organismos del género Pneumocystis se transmiten fácilmente por vía respiratoria. Además, una transmisión vertical por vía placentaria ocurriría en primates (incluyendo la especie humana), sería frecuente en el conejo y parece no existir en ratas ni en ratones. Las técnicas de PCR han mostrado que los pacientes hospitalizados sin pneumocistosis pueden ser portadores de P. jirovecii. En cuanto a los huéspedes inmunocompetentes, se sabe que son capaces de eliminar totalmente la infección. Pero ello no impide que sean parasitados transitoriamente por P. jirovecii y que representen una fuente de infección para huéspedes inmunodeprimidos o no.

Palabras clave: Ciclo biológico, Pneumocystis, taxonomía molecular, transmisión.

Abstract

Cells of Pneumocystis species dwell in the pulmonary alveolus of mammals, where trophic forms of these uneasily cultivable eukaryotic organisms attach specifically to type-1 epithelial alveolar cells by using cytoplasmic extensions (filopodia). It is usually accepted that amoeboid, mononuclear, thin-walled trophic forms (2-8 μm), evolve into spheroid sporocytes (3-6 μm) and then into thick-walled cysts (ascii) (4-6 μm), which at maturation contain eight spores (or ascospores). Ascospores leave the cyst through a preformed pore to initiate a new generation of trophic forms. Recently, we were able to determine the DNA content of each Pneumocystis life cycle parasite stage by using high throughput cytometry. The same strategy is being used to explore the potential contribution of each stage to the Pneumocystis in vitro or in vivo global development.

Pneumocystis organisms are easily transmitted by airborne route. Moreover, vertical, in utero transmission could occur in primates (including humans), would be frequent in rabbits, and apparently it does not occur in rats or mice. Molecular techniques have shown that hospitalized patients without pneumocystosis can be carriers of P. jirovecii. Regarding immunocompetent subjects, we know they are able to radically eliminate the infection, but they can be transiently infected by P. jirovecii and constitute an actual infection source to immunocompromised or immunocompetent hosts.

Keywords: Life cycle, Pneumocystis, molecular taxonomy, transmission.

Pneumocystis y pneumocistosis hoy

La pneumocistosis (en inglés: "*Pneumocystis Pneumonia*" o, abreviada: PcP) es la enfermedad causada en los mamíferos por hongos del género *Pneumocystis*. Se manifiesta principalmente como una infección oportunista que produce neumonía grave en mamíferos profundamente inmunodeprimidos. En el caso del hombre, la especie *Pneumocystis jirovecii* es, hasta ahora, el único agente causante conocido de PcP. Esta enfermedad cosmopolita constituye probablemente la afección respiratoria grave observada con más frecuencia en pacientes inmunodeprimidos en el mundo. Con gran impacto en los primeros años de la pandemia de SIDA, la PcP plantea todavía importantes problemas diagnósticos, terapéuticos y preventivos [1].

El dramático incremento en la incidencia de PcP constatado durante los primeros años de la pandemia de SIDA, situó a la pneumocistosis como un problema médico y de salud pública de primer orden. Entre 1981 y 1989, un 60 a 80% de los sujetos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) presentaban una pneumocistosis [2]. La incidencia de esta neumonitis oportunista disminuyó en los pacientes con SIDA con el empleo de quimioprofilaxis basada en el uso de la asociación trimetoprima/sulfametoxazol (TMP/SMX) por vía oral o de pentamidina en aerosol, pasando en EE.UU. del 53% en 1989 al 42% en 1992, aunque el número total de casos permaneció estable debido al incremento de la incidencia de SIDA [3]. Coincidiendo con la introducción de los primeros fármacos antirretrovirales la incidencia de PcP disminuyó anualmente un 3,4% entre 1992 y 1995, aunque la reducción más marcada se produjo a partir de 1996 con la generalización de la utilización de la terapia de combinación con

antirretrovirales de gran actividad (HAART: "highly active antiretroviral therapy") que indujo un descenso del 21,5% de la incidencia anual entre 1996 y 1998. De forma similar, la incidencia de PcP en pacientes con infección VIH disminuyó en Europa desde 4,9 casos por cada 100 persona-años antes de 1995 a 0,3 casos por 100 personas-año después de 1998. Sin embargo, la PcP continúa siendo la infección oportunista más frecuente definitoria de SIDA en EE.UU. y Europa occidental.

Informes recientes muestran una elevada incidencia de PcP tanto en niños como en adultos VIH positivos en países en vías de desarrollo, incluyendo países de África donde los primeros estudios mostraban una baja incidencia de PcP. Probablemente, este incremento se debe, por lo menos en parte, a una mejora de los métodos diagnósticos. En efecto, los primeros estudios subestimaron la frecuencia de PcP en África dadas las dificultades diagnósticas de esta neumonía. Actualmente, la PcP asociada al SIDA sigue siendo una enfermedad grave en sujetos que desconocen su infección VIH, en personas sin acceso al tratamiento antirretroviral o que no lo cumplen y en sujetos que escapan a la quimioprofilaxis o en los que esta no resulta efectiva quizás por la emergencia de cepas resistentes [4].

Por otra parte, la pneumocistosis está adquiriendo una importancia cada vez mayor en sujetos sin infección VIH pero inmunodeprimidos por otras causas. En la medicina actual cada vez son más frecuentes los pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores por enfermedades autoinmunes, trasplantes o neoplasias que tienen un riesgo elevado de desarrollar PcP. Los corticoides se consideran uno de los principales factores de riesgo, bastando la utilización de dosis equivalentes a más de 16 mg de prednisona durante más de 8 semanas para aumentar de forma significativa el riesgo de PcP. Las situaciones subyacentes asociadas con más frecuencia al desarrollo de PcP en pacientes sin infección VIH incluyen los procesos oncohematológicos, los tumores malignos sólidos, sobre todo cerebrales, las enfermedades autoinmunes, principalmente la granulomatosis de Wegener y el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad inflamatoria intestinal, los trasplantes alogénicos, la malnutrición calórico-proteica y las inmunodeficiencias congénitas [1]. En algunas de estas circunstancias la PcP puede alcanzar una incidencia del 40% con tasas de mortalidad a veces superiores (40-50%) a las registradas en los pacientes con SIDA, sobretodo en pacientes que requieren respiración artificial [5, 6, 7].

En realidad, la situación es aún más compleja. Datos experimentales indican que los organismos del género *Pneumocystis* se transmiten fácilmente por vía respiratoria entre huéspedes de la misma especie, dado que las especies conocidas hasta ahora son estenoxénicas (=presentan una especificidad parasitaria estricta) [2, 8, 9, 12]. De hecho, en las poblaciones humanas podrían infectarse sujetos con diversos niveles de inmunidad dando lugar a cuadros clínicos de gravedad variable, que actualmente no son atribuidos a *Pneumocystis*. Estudios seroepidemiológicos realizados por varios equipos han mostrado que más del 80% de la población infantil desarrolla una primoinfección por *Pneumocystis*, lo que hace de este parásito uno de los patógenos cosmopolitas que con más frecuencia afectan al hombre a lo largo de su vida. Por esta razón, es probable que el impacto clínico-epidemiológico real de la infección por *Pneumocystis* esté habitualmente subestimado, conociéndose solamente la parte visible del iceberg [2].

Estos últimos aspectos, en particular la problemática de la transmisión y del rol potencial de reservorio y fuente de infección de los hospedadores inmunocompetentes, han inspirado

investigaciones recientes de nuestro equipo sobre el ciclo biológico y la circulación de las especies de *Pneumocystis* en las poblaciones de mamíferos. La presente contribución intenta resumir los principales resultados de tales investigaciones, que cambian considerablemente las concepciones tradicionales sobre la historia natural de la infección por *Pneumocystis* (Figura 1) [8, 9].

Ciclo biológico de los hongos del género *Pneumocystis*

El hábitat específico de los organismos del género *Pneumocystis* es el alvéolo pulmonar. Allí, las formas vegetativas o tróficas de estos organismos eucariotas adhieren específicamente a las células epiteliales alveolares de tipo 1 (o neumocitos 1) utilizando prolongaciones citoplásmicas denominadas filópodos. Las formas tróficas (2-8 μm de diámetro), ameboideas, mononucleadas, con pared celular densa cuando son observadas por microscopía electrónica de transmisión (MET), se transforman en esporocitos redondeados (3-6 μm) y luego en quistes (o ascos) (4-6 μm), los cuales cuando maduran, contienen ocho esporas o ascosporas. Estas abandonan el quiste por un orificio preformado iniciando una nueva generación de formas tróficas. La MET ha permitido distinguir tres estadios esporocíticos (esporocito precoz, intermedio y tardío) en función del número de núcleos (uno a ocho) y de la estructura de la pared celular. La primera división nuclear ocurre en el esporocito precoz, en el que se observan complejos sinaptonemales, lo cual muestra que esta división es reduccional o meiótica. Las formas tróficas jóvenes que emergen del quiste maduro adhieren íntimamente a los neumocitos 1 y reinician el ciclo. Serían ellas las que desarrollarían el proceso de fusión nuclear o conjugación que restituye la diploidía [10].

En el curso del ciclo se observa una evolución de las estructuras superficiales. A la capa densa superficial visible por MET en la pared celular de todos los estadios de este hongo parásito, se agrega una capa media poco densa (rica en beta-glucanos) en el esporocito intermedio que perdurará en el quiste maduro o asco. En el espesor de la capa densa superficial, existe una membrana plasmática externa, que evoca la de los procariotas gramnegativos, cuyas funciones son desconocidas. El medio alveolar en el que se encuentra el parásito es rico en fosfolípidos, y los lípidos parecen constituir alrededor 50% de la pared celular de las formas quísticas. En la pared celular de formas tróficas o quísticas se encuentra también ampliamente representada una glicoproteína de 120 kDa (antígeno mayor superficial: MSA, o MSG), codificada por una familia multigénica que permite la expresión de varias decenas de variantes de dicha molécula en el curso de la infección. *Pneumocystis* posee los organelos típicos de una célula eucariota, mitocondria y un sistema endomembranoso bien desarrollado, que comprende un retículo endoplásmico complejo, con sáculos especializados, lisosomas y un aparato de Golgi [11].

En la medida en que no disponemos aún de cultivos de *Pneumocystis* que permitan un seguimiento del desarrollo sincrónico in vitro de estos hongos, el ciclo que acabamos de describir se apoya en un conjunto de hipótesis basadas en razonamientos analógicos - que tienen en cuenta lo que se conoce sobre el ciclo biológico de otros ascomicetos-, observaciones ultraestructurales y experimentos complejos en los que se han empleado modelos experimentales in vivo e in vitro. La mayoría de los estudios sobre el ciclo han sido hechos con *P. carinii*, especie que parasita la rata *Rattus norvegicus*. Sin embargo, muchas observaciones han sido hechas en *P. oryctolagi* [12], la única especie descrita en el de conejo *Oryctolagus cuniculus*, y algunas en

P. murina, del ratón *Mus musculus*.

Estadio	Nombre	Contenido en ADN (C)	Ploidía (n)	Número de cromátidas	Número de núcleos	Pared celular
	Forma trófica joven	1C	1n	1	1	Fina
	Forma trófica	1C, 2C	1n, 2n	1	1	Fina
	Esporocito precoz	4C	2n - 1n	2	1 - 2	Fina
	Esporocito intermedio	4C, 8C	1n	1	4 - 8	Gruesa
	Esporocito tardío	8C	1n	1	8	Gruesa
	Quiste maduro (asco)	8C	1n	1	8	Gruesa
	Ascospora	1C	1n	1	1	Fina

Figura 1. Caracterización de los diversos estadios del ciclo biológico de organismos del género *Pneumocystis*. La representación está basada en los resultados de trabajos sobre la especie *Pneumocystis carinii* (de la rata *Rattus norvegicus*) y tiene en cuenta la determinación reciente de la ploidía basada en el uso de métodos citométricos de alto rendimiento [15]. Estas observaciones sugieren que la forma trófica haploide, se vuelve diploide por conjugación. El estadio resultante evoluciona en esporocito intermedio en el cual ocurre la meiosis. Así, los estadios siguientes, esporocito intermedio, tardío, quiste maduro o asco y las ocho ascosporas que el genera, son haploides. El número de núcleos y el espesor de la pared celular de cada estadio son indicados en las dos últimas columnas.

Exceptuando las observaciones ultraestructurales, objeto de revisiones recientes [10, 11, 12], las principales interrogantes sobre el ciclo de *Pneumocystis* que hemos podido abordar por el momento son las siguientes: (a) cual es la ploidía de los diversos estadios parasitarios; (b) puede la forma trófica replicarse por fisión binaria o el desarrollo parasitario se limita a la maduración quística (que multiplica potencialmente por 8 la población parasitaria). Sin cultivos eficaces la opción metodológica para abordar ambos puntos fue la citometría de flujo de alto rendimiento [13], que nos permitió, por una parte, separar las células fúngicas de *P. carinii* de los restos del tejido pulmonar con una pureza de casi 100%, y por otro lado, obtener fracciones perfectamente separadas de estadios tróficos (con pared celular fina) y de estadios quísticos (con pared celular gruesa) (pureza=99.6% ± 0.3%).

Procedemos extrayendo los parásitos de los pulmones de ratas inoculadas por vía endotraqueal con *P. carinii* y sometidas a dexametasona oral durante 8-10 semanas, empleando las técnicas usadas desde hace varios años en el laboratorio [14]. Luego, la suspensión parasitaria es tratada con dos anticuerpos: un anticuerpo policlonal (marcado con un conjugado que contiene el marcador fluorescente rojo Alexa-647) que reconoce todos los estadios, y un anticuerpo monoclonal (marcado con un conjugado que contiene el marcador fluorescente verde Alexa-488) específico de las formas quísticas. Se procede entonces a la separación por citometría de todos los estadios del tejido pulmonar y luego a la de las formas tróficas (marcadas solamente por el anticuerpo policlonal) y de las formas quísticas (marcadas con los dos anticuerpos) [13]. El proceso altera poco la estructura celular de los parásitos que pierden sin embargo alrededor del 35% de su poder infeccioso para la rata atímica bajo dexametasona. La pérdida de infectividad parece estar asociada al co-marcaje con los dos anticuerpos y no al tratamiento citométrico [13].

Una vez establecida la reproductibilidad y la eficiencia de los métodos citométricos de alto rendimiento que acabamos de evocar, la primera aplicación ha sido la determinación de la ploidía de los estadios de *P. carinii* usando el intercalante del ADN "SYTOX Green". Este estudio [10, 15] mostró que las células parasitarias contenidas en la fracción quística contienen 8C de ADN (8 "contenidos" de ADN), lo cual consolida la hipótesis de la generación de 8 esporas haploides en cada quiste. Una vez liberadas, las esporas devienen formas tróficas, que se revelaron haploides (1C) en su mayoría. Sin embargo, una sub-fracción de formas tróficas contenía formas con 2C de ADN, sugiriendo que han desarrollado un proceso de conjugación ("mating"), de fisión binaria asexual o ambos procesos sucesivamente. El hallazgo de otras formas tróficas, una sub-fracción aún más pequeña, con 4C de ADN, sugiere que las formas tróficas diploides puedan desarrollar divisiones mitóticas. Finalmente, la identificación inesperada de formas tróficas triploides (3C), sugiere que *P. carinii* puede desarrollar mitosis asimétricas, un sistema que en otros hongos es una fuente de diversidad genética cuyo costo energético es más bajo que el insumido por la conjugación [15].

Investigaciones sobre la difusión aérea de la forma infecciosa de *Pneumocystis carinii*

No sabemos aún que estadio o estadios parasitarios son capaces de transmitir la infección de un hospedador a otro. La vía más importante de transmisión es la vía respiratoria y el ADN de *Pneumocystis* ha sido identificado por PCR en muestras de filtrados de aire por varios autores y, más raramente, en muestras de agua (ver [9] por detalles y discusión de este punto). Sin embargo, no se ha podido identificar morfológicamente ningún estadio parasitario en esas muestras ambientales.

La cuestión de la presencia de formas infecciosas de *Pneumocystis* en el aire, además de su interés puramente científico, tiene un interés práctico. En efecto, la transmisión respiratoria entre hospedadores ocurre con frecuencia entre animales inmunodeprimidos de laboratorio (ratones SCID o ratas atímicas) con PcP o simplemente entre animales inmunocompetentes (ratones Balb/c, simios), sin PcP pero portadores de bajas tasas parasitarias, detectables en general solamente por PCR (hospedadores "colonizados") [8, 9, 16, 17, 18]. Esas modalidades de transmisión respiratoria parecen ocurrir también en las poblaciones humanas [1, 19] en las que los individuos colonizados (sin PcP) han sido muy estudiados [1, 19, 20, 21, 22, 23, 24].

Es evidente que la clarificación de los mecanismos implicados en la transmisión respiratoria de *Pneumocystis* es de gran importancia para la definición de estrategias de prevención. Así, por razones científicas y con motivaciones prácticas claras (prevenir la PcP nosocomial), se ha recientemente abordado el estudio de la dinámica de la contaminación del aire ambiente durante la respiración del hospedador con PcP [25, 26].

El ADN de *P. jirovecii* a sido cuantificado por PCR cuantitativa en filtrados de aire de habitación de pacientes hospitalizados [25]. A 1 m de distancia de la cabeza del paciente, 0.008 a 4.5×10^6 copias del genoma de *P. jirovecii* / m³ fueron detectadas en 15/19 pacientes (80%). Las cantidades disminuyen en función de la distancia del paciente, pero el ADN de *P. jirovecii* era aún detectable en 33% de las muestras de aire captadas en el corredor, a 8 m de distancia, mientras que 40 muestras captadas más lejos, se revelaron negativas [25]. La misma problemática fue abordada con más detalle en ratas infectadas por vía endotraqueal con *P. carinii* [26]. Se uso también la PCR cuantificando paralelamente en cinética el ADN de *P. carinii* en muestras del aire ambiente que rodea a las ratas (mantenidas bajo barrera) y en los pulmones de estos animales, agregando el conteo microscópico de los parásitos en el tejido pulmonar. El ADN de *P. carinii* fue detectado en el aire desde el fin de la primera semana post-infección. Las cantidades aumentaron gradualmente hasta alcanzar un estado estacionario hacia las 4 o 5 semanas post-infección. Una clara correlación entre las cantidades de ADN de *P. carinii* detectadas en el aire y las tasas parasitarias detectadas paralelamente por PCR y por conteo microscópico en los pulmones de las ratas fue observada. Parece pues posible estimar la biomasa parasitaria en los pulmones del hospedador a partir de las cantidades de ADN parasitario detectadas en muestras del aire ambiente captado en su entorno [26]. Estos trabajos proporcionan las bases teóricas y técnicas justificando una detección sistemática del ADN de *Pneumocystis* en el entorno de hospedadores fuente potencial de infección y expuestos, en el contexto de la definición de medidas preventivas en el hospital.

La biología de *Pneumocystis murina* en el pulmón de hospedadores sanos

La detección frecuente de tasas bajas de parasitismo por *Pneumocystis* en hospedadores sin PcP plantea al menos dos interrogantes: (a) qué impacto tiene ese pauci-parasitismo en la salud del hospedador? (b) cual es su significación en la biología del parásito? La primera cuestión ha sido ampliamente abordada en el hombre a través del estudio de portadores o sujetos colonizados, como mencionado arriba. *P. jirovecii* ha así sido detectado por PCR en los pulmones de sujetos sanos o afectados por enfermedades pulmonares crónicas como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la fibrosis quística y otras afecciones respiratorias, como la neumonía intersticial idiopática [1, 20, 21, 22, 23, 24]. En algunos de esos contextos, especialmente en EPOC [18, 20], fue mostrado que *P. jirovecii* induce cambios inflamatorios locales o sistémicos que podrían contribuir a las exacerbaciones y acelerar la evolución de la afección. Trabajos recientes en un modelo primate de colonización por *Pneumocystis* [18], aportan, efectivamente, evidencias de un rol de este agente fúngico en la instalación de la EPOC (progresión del enfisema, aumento del tejido linfoide asociado a los bronquios, de citoquinas Th-2, de mediadores pro-inflamatorios y perturbación de la función pulmonar). Sin embargo, en esas observaciones, no se había abordado el estado efectivo de las células de *Pneumocystis* en el pulmón de hospedadores *a priori* inmunocompetentes o, al menos, no inmunocomprometidos.

Esas razones despertaron nuestro interés, ya desde el año 2000 [28], por la biología de *Pneumocystis* en el pulmón de hospedadores "normales", sanos, términos difíciles de definir pero que pueden ser aceptados al menos intuitivamente. Ello nos condujo a desarrollar un modelo ratón de colonización [17, 28], basado en un modelo de transmisión que habíamos desarrollado 10 años antes [29]. La pregunta que nos planteamos fue la siguiente: cuál es el comportamiento de las células de *Pneumocystis* en el pulmón de hospedadores inmunocompetentes? El tema tiene un gran interés, puesto que lo que conocemos de la biología de *Pneumocystis* proviene sobretodo de estudios realizados en hospedadores con PcP (natural o experimental), circunstancia que parece rara en la historia natural de estas infecciones [8], como lo veremos abajo.

El modelo de transmisión/colonización consiste en exponer ratones SCID ("severe combined immunodeficiency síndrome") o ratones inmunocompetentes no portadores, a ratones SCID con PcP. La exposición consiste en albergarlos en la misma caja ("co-housing") durante períodos variados. Sistemáticamente, los ratones SCID expuestos desarrollan una PcP y los ratones inmunocompetentes (en general hemos usado la cepa Balb/c) se vuelven portadores de *P. murina* o colonizados. Estos últimos, eliminan radicalmente la infección al cabo de algunas semanas. Pero durante el periodo de portaje, pueden transmitir la infección por vía respiratoria tanto a ratones SCID como a ratones Balb/c [17, 28]. Más importante aún, es el hecho que los animales portadores que han contraído la infección por vía respiratoria a través de otros portadores, pueden transmitirla a ratones SCID [17, 30]. En el trabajo inicial y en los siguientes, hemos constatado que un tiempo de contacto (o de "co-housing") de menos de un día, alcanza para que la infección se transmita. El interés de estas observaciones para comprender la circulación de *Pneumocystis* en el ambiente hospitalario y de la epidemiología de la PcP nosocomial, no necesita comentarios [17].

Al mismo tiempo era necesario clarificar el comportamiento de *Pneumocystis* en el alvéolo pulmonar de los hospedadores inmunocompetentes colonizados (= sin PcP): son sus células capaces de adherir al epitelio, como en el alvéolo del hospedador inmunodeprimido, de multiplicarse, de estimular una respuesta local o general? Abordamos estos diversos puntos en el ratón Balb/c inmunocompetente y colonizado "naturalmente" por vía respiratoria por exposición a ratones SCID con PcP. Asociando métodos histológicos, inmunológicos y moleculares, pudimos así establecer los siguientes hechos [17]: (a) *P. murina* desarrolla muy bajas tasas de parasitismo en el ratón inmunocompetente, que son sin embargo detectables histológicamente: los parásitos aparecen íntimamente adheridos al epitelio alveolar y no parecen estimular una respuesta inflamatoria detectable morfológicamente; (b) usando una técnica de PCR de retro-transcripción (RT-PCR) hemos revelado que los genes de una serina-treonina cinasa ciclina-dependiente y de una HSP-70 se expresan en *P. murina*, demostrando que las células fúngicas son viables y capaces de multiplicarse en el alvéolo pulmonar de hospedadores inmunocompetentes; (c) los ratones Balb/c 12 días después de ser separados de los ratones SCID con PcP, desarrollan una respuesta humoral detectable por Western-blot en sus sueros [17]. Estos trabajos demuestran que los hospedadores inmunocompetentes pueden desempeñar el rol de fuente de infección y además de reservorio del agente. Como estos hospedadores al cabo de algunas semanas eliminan radicalmente los parásitos, hemos nosotros propuesto en 2000 la noción de reservorio *dinámico* para las especies de *Pneumocystis* [2, 17].

En suma, los hospedadores inmunocompetentes (portadores potenciales sin PcP) son mucho más numerosos en las poblaciones de mamíferos que los hospedadores inmunodeprimidos (altamente sensibles a la infección por *Pneumocystis* pudiendo entonces desarrollar una PcP). Esos hospedadores inmunocompetentes se infectan regularmente por vía respiratoria, transmiten activamente los parásitos con el aire expirado, y crean una respuesta inmune eficaz que elimina *Pneumocystis* de sus pulmones, pero pueden volver a infectarse al cabo de cierto tiempo. Hospedadores vírgenes de la infección, como los niños pequeños, desarrollan probablemente infecciones primarias más importantes aunque benignas, puesto que tienen en general un nivel adecuado de inmunocompetencia creciente con la edad. Otros hospedadores con depresión inmunitaria pasajera o discreta (mujeres embarazadas, ancianos) podrían también contraer más fácilmente la infección y desempeñar así un rol reservorio/fuente de infección más eficaz. Estas apreciaciones no son solamente hipotéticas: la sensibilidad más grande al portaje en dichas subpoblaciones (niños pequeños, mujeres embarazadas) ha sido puesta en evidencia por varios estudios (ver la revisión reciente [8]).

Transmisión vertical de especies de *Pneumocystis*

Probablemente la vía respiratoria no es la única modalidad de transmisión de las especies de *Pneumocystis* entre hospedadores. En efecto, la transmisión intrauterina materno-fetal parece ser otro medio empleado por estos hongos para circular en las poblaciones de mamíferos (ver [31], revisión reciente). Evidencias de ese modo de transmisión han sido reportadas en primates (incluyendo el ser humano) y lagomorfos, cuyos tipos de placenta, hemomonochorial y hemodichorial, respectivamente, son similares. En cambio, la transmisión intrauterina de *Pneumocystis* no parece existir en roedores (placenta hemotricorial).

La transmisión vertical de *Pneumocystis* en el ser humano se sospecha desde hace largo tiempo. Un portaje bastante frecuente (15.5%) de *P. jirovecii* fue detectado en mujeres embarazadas multíparas y no en mujeres no embarazadas de la misma edad y del mismo medio [32]. Evidencias morfológicas de la presencia de quistes de *Pneumocystis* en el pulmón de un feto y en la placenta (fin de segundo trimestre de gestación, madre VIH positiva con PcP durante el embarazo) fueron publicadas en 1995 [33] pero la calidad de las imágenes fue cuestionada [34]. Trabajos anteriores a la pandemia de SIDA sugerían también una transmisión transplacentaria de *Pneumocystis* en humanos sin aportar pruebas irrefutables. El estudio más reciente sobre el tema ha sido publicado en 2009. En este trabajo, el ADN de *Pneumocystis* fue detectado por PCR en los pulmones de 7/20 (35%) fetos humanos y en 1/20 (5%) placentas de 20 casos de aborto "espontáneo" [35]. Los autores se interrogan sobre un rol potencial de *P. jirovecii* en esos abortos. Sobre la transmisión *in utero* en otros primates, un solo trabajo, según nuestras informaciones, reporta la detección por PCR de *Pneumocystis* en los pulmones de dos gemelos de Tití común (*Callithrix jacchus*) nacidos muertos [36].

Finalmente, es el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) el modelo animal que se reveló más interesante para estudiar la transmisión congénita de *Pneumocystis oryctolagi* (especie de *Pneumocystis* específica del conejo) [37, 38]. Este mamífero desarrolla casi siempre una PcP benigna espontánea en el destete [12] que corresponde a la infección primaria por *Pneumocystis*. En un primer estudio (89 fetos de 16 hembras), detectamos *Pneumocystis* histológicamente, por inmunofluorescencia y por PCR en los pulmones fetales, en la placenta y en el líquido amniótico, a partir del décimo día de gestación, de casi todas las fetos analizados [37]. La transmisión materno-fetal parecía pues ser sumamente frecuente en este lagomorfo.

Recientemente, hemos confirmado esas observaciones usando métodos moleculares en nuevos experimentos desarrollados paralelamente en Lille y en Santiago de Chile [38]. Es interesante notar que detectamos *Pneumocystis* en 29% a 100% de los fetos examinados, pero solamente en aquellos de conejas multíparas. Ello sugiere que la transmisión *in utero* de *P. oryctolagi* es favorecida por el agotamiento progresivo asociado a la alta frecuencia de las gestaciones a las cuales son sometidas las conejas en los criaderos industriales.

La transmisión *in utero* de *P. oryctolagi* es coherente con la alta frecuencia del portaje de *Pneumocystis* constatada en las colonias de conejos [12]. En efecto, la transmisión transplacentaria asegura una diseminación "protegida" del hongo, al abrigo de factores limitantes potenciales del medio ambiente. Otros patógenos eucariotas emplean la misma estrategia. Es el caso, por ejemplo, de la transmisión transplacentaria y galactógena de los nematodos ascárides del género *Toxocara* [39], o de la coccidia tisular *Toxoplasma gondii*, que parece ser, en los animales, mucho más frecuente de lo que se piensa [40].

La pneumocistosis, evento raro en la historia natural de la infección por *Pneumocystis*

Para acceder a una comprensión global de la biología básica y del poder patógeno real de los micro-hongos del género *Pneumocystis* es necesario pensar este grupo como un conjunto de entidades taxonómicas muy diversificadas ampliamente distribuidas en los ecosistemas, cuyo interés científico va mucho más allá de su role patógeno para los seres humanos. Una consideración de las especies de *Pneumocystis* en una perspectiva "bottom-up" conduce a situar estos parásitos del pulmón de los mamíferos en el paisaje del mundo viviente, una condición esencial para poder entender su naturaleza específica y los tipos de relación que ellos establecen con sus hospedadores.

Solo hace pocos años pudo establecerse la naturaleza fúngica de los organismos del género *Pneumocystis*, y la divergencia genética estable de sus representantes adaptados a las diversas especies de mamíferos hospedadores [12]. Además, experimentos de infección cruzada demostraron claramente el estenoxenismo (=especificidad parasitaria estrecha) de las especies del género [8]. Tales resultados condujeron a describir como especies genuinas las cepas de *Pneumocystis* adaptadas a cada mamífero, esencialmente siguiendo el Concepto Filogenético de Especie [41]. Cinco especies han sido formalmente descritas hasta ahora: *P. carinii* y *P. wakefieldiae* en ratas, *P. jirovecii* en el hombre, *P. murina* en el ratón de laboratorio, y *P. oryctolagi* en el conejo del Viejo Mundo [8, 12].

Técnicas moleculares muy sensibles revelaron una alta prevalencia de *Pneumocystis* en los mamíferos salvajes de diversos continentes. Efectivamente, una proporción elevada de hospedadores (por ejemplo, aproximadamente 50% de micro-mamíferos capturados en Tailandia) [8] alberga en general bajas tasas de parasitismo pulmonar [42]; se habla de hospedadores colonizados por *Pneumocystis*, con infección "latente" o "subclínica", o de portadores. La transmisión respiratoria entre hospedadores, bien establecida entre roedores de laboratorio, parece muy activa en las poblaciones naturales. Asociada a la transmisión vertical por vía transplacentaria, por lo menos en algunos mamíferos [35], o por vía respiratoria, entre la madre y los recién nacidos inmediatamente luego del nacimiento [43], explica probablemente la fuerte prevalencia de la colonización por *Pneumocystis*, que se observa habitualmente en las poblaciones naturales.

Desde un punto de vista evolutivo, la co-filogenia o co-evolución [44] emerge como el modelo dominante de las especies de *Pneumocystis*, las cuales habitan el alvéolo pulmonar de los mamíferos desde hace más de 100 millones de años [45]. La co-evolución explica seguramente la excelente adaptación de las células de *Pneumocystis* al desarrollo y la multiplicación en los alvéolos pulmonares de los mamíferos inmunodeprimidos e inmunocompetentes, que pueden así actuar como reservorio [17]. Globalmente, las especies del género *Pneumocystis* ilustran el concepto de especificidad filogenética, aplicado a parásitos bien adaptados a sus hospedadores, manifestando baja patogenicidad, especificidad estricta mantenida a lo largo de la evolución, colonización extensa de las poblaciones del hospedador, y un ciclo biológico sincronizado con la fisiología de este último [46]. En acuerdo con tales nociones, la PcP ha sido raramente reportada en los mamíferos salvajes, apareciendo como un evento infrecuente en la historia natural de las infecciones por *Pneumocystis*: "la parte visible del iceberg", como lo escribimos en el año 2000 [2]. La adaptación fina de *Pneumocystis* a la vida en el alvéolo pulmonar conforta este punto de vista [17].

La pneumocistosis se manifiesta en hospedadores profundamente inmunodeprimidos. Sin embargo, otros factores parecen influenciar su gravedad, como la sorprendente coinfección pulmonar con tricomonádidos que hemos reportado en pacientes con PcP y SIDA [47]. Un más amplio espectro patológico de las infecciones por *Pneumocystis* existe sin duda en las poblaciones naturales, en las cuales hallamos sub-poblaciones con diversos niveles de capacidad de defensa inmune. Por ejemplo, los niños sanos sin contacto previo con *Pneumocystis*, desarrollan probablemente una infección primaria potencialmente asociada con síntomas respiratorios benignos [ver 8, por revisión]. Lo mismo parece ocurrir en otros mamíferos, como los conejos [12] y los cerdos, en este último caso con un impacto financiero probable [48]. Igualmente, y como ya mencionado, *Pneumocystis* ha sido detectado con frecuencia en recién nacidos, niños pequeños, mujeres embarazadas y sujetos con enfermedades respiratorias crónicas. En esas situaciones, estos hongos microscópicos parecen comportarse como un factor de co-morbilidad. La infección por *Pneumocystis* de hospedadores no inmunocomprometidos emerge así como una temática relevante tanto en salud humana como animal.

Referencias

1. Calderon EJ, Gutiérrez-Rivero S, Durand-Joly I, y Dei-Cas E (2010) *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **8**: 683-701
2. Dei-Cas E (2000) *Med. Mycol.* **38** (Suppl-1): 23-32
3. Hull MW, Phillips P, y Montaner JSG (2008) *Chest* **134**: 1287-1298
4. Fisk DT, Meshnick S, y Kazanjian PH (2003) *Clin. Infect. Dis.* **36**: 70-78.
5. Monnet X, Vidal-Petiot E, Osman D, Hamzaoui O, Durrbach A, Goujard C, Miceli C, Bourée, P, y Richard C (2008) *Crit. Care* **25**: R28
6. Catherinot E, Lanternier F, Bognoux ME, Lecuit M, Couderc LJ, y Lortholary O. (2010) *Infect. Dis. Clin. North Am.* **24**:107-138
7. Bollée G, Sarfati C, Thiéry G, Bergeron A, de Miranda S, Menotti J, de Castro N, Tazi A, Schlemmer B, y Azoulay E (2007) *Chest* **132**: 1305–1310
8. Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, Aliouat EM, Viscogliosi E, Guillot J, Delhaes L, y Dei-Cas E (2008) *Infect. Genet. Evol.* **8**: 708-726
9. Chabé M, Aliouat-Denis CM, Delhaes L, Aliouat el M, Viscogliosi E, y Dei-Cas E (2011)

FEMS Yeast Res. **11**: 2-17

10. Aliouat-Denis CM, Martinez A, Aliouat EM, Pottier M, Gantois N, y Dei-Cas E (2009) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**: 419-426
11. Dei-Cas E, Aliouat EM, y Cailliez JC (2004) Cellular Structure. In: 'Pneumocystis Pneumonia' 3rd edition, Walzer PD, Cushion MT (eds), (Marcel Dekker, Inc., New York), p 61-94
12. Dei-Cas E, Chabé M, Moukhliis R, Durand-Joly I, Aliouat EM, Stringer JR, Cushion MT, Noel C, Sybren de Hoog G, Guillot J, y Viscogliosi E (2006) *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 853-871
13. Martinez A, Aliouat EM, Pottier M, Gantois N, Pinçon C, Standaert-Vitse A, Dei-Cas E, y Aliouat-Denis CM (2009) *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**: 446-453
14. European Concerted Action on *Pneumocystis carinii* (1996) *Parasitol. Today* **12**: 245-249
15. Martinez A, Aliouat EM, Standaert-Vitse A, Werkmeister E, Pottier M, Pinçon C, Dei-Cas E, y Aliouat-Denis CM (2011) *PLoS One* (in press)
16. Chabé M, Herbreteau V, Hugot JP, Bouzard N, Deruyter L, Morand S, Dei-Cas E (2010) *J. Eukaryot. Microbiol.* **57**: 213-217
17. Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, Durand-Joly I (2004) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**: 89-97
18. Shipley TW, Kling HM, Morris A, Patil S, Kristoff J, Guyach SE, Murphy JE, Shao X, Sciarba FC, Rogers RM, Richards T, Thompson P, Montelaro RC, Coxson HO, Hogg JC, Norris KA (2010) *J. Infect. Dis.* **202**: 302-312
19. Rivero L, de la Horra C, Montes-Cano MA, Rodríguez-Herrera A, Respaldiza N, Friaza V, Morilla R, Gutiérrez S, Varela JM, Medrano FJ, Calderón EJ (2008) *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 1116-1118
20. Calderón EJ, Rivero L, Respaldiza N, Morilla R, Montes-Cano MA, Friaza V, Muñoz-Lobato F, Varela JM, Medrano FJ, Horra Cde L (2007) *Clin. Infect. Dis.* **45**: e17-19
21. Montes-Cano MA, de la Horra C, Respaldiza N, Medrano FJ, Varela JM, Calderon EJ. (2006) *J. Infect. Dis.* **193**: 1332-1333
22. Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena FJ, Mateos I, Friaza V, Respaldiza N, Muñoz-Lobato F, Medrano FJ, Calderon EJ, Varela JM (2007) *Clin. Microbiol. Infect.* **13**: 1008-1011
23. Mekinian A, Durand-Joly I, Hatron PY, Moranne O, Denis G, Dei-Cas E, Morell-Dubois S, Lambert M, Launay D, Delhaes L, Hachulla E, Queyrel V (2011) *Rheumatology (Oxford)* **50**: 569-577
24. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L (2008) *J. Infect. Dis.* **197**: 10-17
25. Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet JC, Nevez G, Garin YJ, Derouin F, Totet A (2010) *Clin. Infect. Dis.* **51**: 259-265
26. Choukri F, Aliouat EM, Menotti J, Totet A, Gantois N, Garin YJ, Bergeron V, Dei-Cas E, Derouin F (2011) *J. Infect. Dis.* **203**: 1333-1336
27. Calderon EJ y Dei-Cas E (2010) *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **8**: 259-262
28. Dumoulin A, Mazars E, Seguy N, Gargallo-Viola D, Vargas S, Cailliez JC, Aliouat EM, Dei-Cas E (2000) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**: 671-678
29. Soulez B, Palluault F, Cesbron, J.Y., Dei-Cas E, Capron, A., Camus D (1991) *J. Protozool.* **38** (Suppl.): 123-125
30. Gigliotti F, Harmsen AG, y Wright TW (2003) *Infect. Immun.* **71**: 3852-3856
31. Chabe M, Nevez G, Totet A, Frealle E, Delhaes L, Aliouat EM, y Dei-Cas E (2009) *J. Mycol. Méd.* **19**: 276-84
32. Vargas SL, Ponce CA, Sanchez CA, Ulloa AV, Bustamante R, y Juarez G (2003) *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 605-606
33. Mortier E, Pouchot J, Bossi P, y Molinie V (1995) *N. Engl. J. Med.* **332**: 825
34. Hughes WT (1995) *N. Engl. J. Med.* **333**: 320-321

35. Montes-Cano MA, Chabe M, Fontillon-Alberdi M, de la Horra C, Respaldiza N, Medrano FJ, Varela JM, Dei-Cas E, y Calderon EJ (2009) *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 125-127
36. Demanche C, Petit T, Moisson P, Ollivet F, Rigoulet J, Chermette R, Dei-Cas E, Wakefield E, y Guillot J (2003) *Vet. Rec.* **152**: 811-813
37. Ceré N, Drouet-Viard F, Dei-Cas E, Chanteloup N, y Coudert P (1997) *Parasite* **4**: 325-330
38. Sanchez CA, Chabé M, Aliouat EM, Durand-Joly I, Gantois N, Conseil V, López C, Duriez T, Dei-Cas E, y Vargas SL (2007) *Med. Mycol.* **45**: 701-707.
39. Dei-Cas E (1996) *Encyclop. Méd.-Chir.* (Paris, France), Maladies Infectieuses, **8-518-A-10**, 16p
40. Hide G, Morley EK, Hughes JM, Gerwash O, Elmahaishi MS, Elmahaishi KH, Thomasson D, Wright EA, Williams RH, Murphy RG, y Smith JE (2009) *Parasitology.* **136**: 1877-1885
41. Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, y Fisher MC (2000) *Fungal Genet. Biol.* **31**: 21-32
42. Chabé M, Herbreteau V, Hugot JP, Bouzard N, Deruyter L, Morand S, y Dei-Cas E (2010) *J. Eukaryot. Microbiol.* **57**: 213-217
43. Icenhour CR, Rebholz SL, Collins MS, y Cushion MT (2002) *Eukaryot. Cell* **1**: 414-419
44. Hugot JP, Demanche C, Barriel V, Dei-Cas E, Guillot J (2003) *Syst. Biol.* **52**: 735-744
45. Keely SP, Fischer JM, y Stringer JR (2003) *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**: S624-S626
46. Humphery-Smith I (1989) *Parasitol. Today* **5**: 385-387
47. Duboucher C, Boggia R, Morel G, Capron M, Pierce RJ, Dei-Cas E, y Viscogliosi E (2007) *Nat. Rev. Microbiol.* **5** (12.), doi:10.1038/nrmicro1621-c1.
48. Cavallini-Sanches EM, Pescador C, Rozza D, Spanamberg A, Borba MR, Ravazzolo AP, Driemeier D, Guillot J, y Ferreiro L (2007) *Med. Mycol.* **45**: 395-399

Semblanza del Dr. Eduardo Dei-Cas



Eduardo Dei-Cas es Doctor en Medicina y en Ciencias biológicas, Profesor Asociado en el servicio de Parasitología-Micología médicas de la Facultad de Medicina (Université de Lille 2) y del Centro Hospitalario Regional y Universitario de Lille (Francia). Es miembro del grupo de investigaciones 'Biology & Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens' (BDEEP), integrado en el *Centre d'Infection et Immunité de Lille* (CIIL, INSERM U1019, CNRS UMR8204) del Instituto Pasteur de Lille. Originario de Montevideo (Uruguay) donde efectuó sus estudios médicos e inició sus estudios científicos, el Dr. Dei-Cas obtuvo una tesis doctoral en ciencias biológicas en la Universidad de Lille-1 (Facultad de Ciencias) en 1978. Desarrolló investigaciones sobre temas parasitológicos (esquistosomiasis, paludismo, criptosporidiosis) y micológicos (pneumocistosis y otras micosis emergentes). Dirigió el equipo BDEEP entre 1988 y diciembre del 2010. Sus aportes sobre la pneumocistosis (ultraestructura, taxonomía molecular, filogenia, coevolución, fisiopatología, transmisión y desarrollo de modelos experimentales) son reconocidos en todo el mundo. Recientemente, su grupo descubrió el rol del protozoario parásito *Cryptosporidium parvum* en la inducción de

cánceres digestivos en ratones SCID. Sus investigaciones son financiadas por instituciones nacionales francesas (Agencia Nacional de la Investigación) e internacionales, en particular por la Comisión Europea.

El Dr. Dei-Cas, que ha sido nombrado en 2010 académico correspondiente de Mérito de la Academia Real de Medicina y Cirugía de Cádiz, es autor de más de 300 publicaciones científicas, de las que más de 200 están referenciadas en PubMed. Es referee de más de 50 revistas científicas internacionales, director de trabajos de numerosos candidatos a PhD en el Instituto Pasteur de Lille, y miembro de tribunales de tesis científicas y médicas en Francia y en Universidades extranjeras. El Dr. Dei-Cas organiza eventos internacionales en el campo de la Parasitología y de la Micología médicas, y fue el coordinador del comité científico internacional del *10th-European Multicolloquium of Parasitology* (EMOP-10, Paris, 2008). Es invitado a dar conferencias en numerosos países (países europeos, Líbano, Túnez, México, Argentina, Chile, Brasil, USA, Canadá). Desarrolla también una actividad de investigación significativa en el campo de la bioética y de la filosofía de la biología, formando parte del equipo pedagógico del master: "Ethique du vivant" ("Médecine et Société") organizado por la UFR de Filosofía de la Universidad de Lille 3, y del consejo del "Espace Ethique Hospitalier et Universitaire" (EEHU) de Lille (Lille, Francia).



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 107-114. 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 GENOMA DEL MEXICANO Y SUS ENFERMEDADES

THE GENOME OF MEXICANS AND THEIR DISEASES

Julio Granados Arriola¹, Alejandra Lara Mejía¹, Bernardo Moreno Peniche²,
Yareth Dueñas Andrade², Enrique Caballé Pérez²

¹División de Inmunogenética, Departamento de Transplantes, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP 14000, México DF

²Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, CP 04510, México DF
julgrate@yahoo.com

Resumen

Desde el conocimiento del genoma humano en el año 2002 se despertó gran interés en conocer la aplicación de conceptos como "alelo", "haplotipo", "locus" y "polimorfismo" a la vida cotidiana. El MHC es la región más polimórfica de todo el genoma y se ubica en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21). El polimorfismo de estos genes se incrementó a partir del movimiento de poblaciones que condicionó un reto en la eliminación de nuevos patógenos. Las poblaciones de América, ante el contacto con individuos europeos en el siglo XVI condicionaron la aparición de epidemias devastadoras de múltiples agentes infecciosos, lo que disminuyó la población de 22 millones hasta un millón al final de la colonia. Este cuello de botella poblacional está hoy en día en camino de equilibrio incorporando nuevos genomas, sin embargo no ha pasado tiempo suficiente para diluir el fuerte componente autóctono. A esto se añade la gran diversidad biológica de México, resultado de localización geográfica intertropical. La epidemiología genética permite identificar variantes genéticas cuya frecuencia es mayor en pacientes con enfermedades autoinmunes, infecciosas o neoplásicas, comparados con individuos sanos del mismo grupo étnico. Los conceptos anteriores intervienen en nuevas disciplinas médicas como la farmacogenómica, la nutrigenómica y la nutrigenética. Otra aplicación es el papel de marcadores genéticos como marcadores diagnósticos y pronósticos de enfermedades. Lo anterior se traduce en un camino hacia la medicina e inmunoprevención individualizadas. Ejemplo de esto son los estudios cáncer cérvicouterino y su relación con el virus del papiloma humano (VPH), cuya interacción es particularmente devastadora en mujeres mexicanas.

Palabras clave: Alelo, haplotipo, genotipo, locus, polimorfismo, grupo étnico, MHC, variabilidad, diagnóstico, prevención.

Abstract

Since the discovery of human genome in 2002, a great interest in the application of certain concepts (such as "allele", "haplotype", "locus", and "polymorphism") to daily living has arisen. The MHC is the genome's most polymorphic region ; it is located in the short arm of chromosome 6 (6p21). These genes' polymorphism increased as a result of population movements, which presented a challenge to the elimination of new pathogens. As a consequence of the contact with European individuals in the 16th century, Native-American populations suffered from ravaging epidemics caused by multiple new infectious agents, which diminished the 22 million population to one million at the end of colonial period. This population bottleneck is nowadays in its way to equilibrium incorporating new genomes; however, it has not been enough time to dilute the intense native component. It can be added to all this, Mexico's great biological diversity, a result of its intertropical geographical location. Genetic epidemiology permits the identification of genetic variants whose frequency is larger in patients with autoimmune, infectious, or neoplastic diseases, compared with healthy individuals pertaining to the same ethnic group. The last concepts take an important part in new medical disciplines, such as pharmacogenomics, la nutrigenomics y la nutrigenetics. Another application is the role of genetic markers as diagnosis and prognosis markers for diseases. The latter is translated into a way towards the individualized medicine and immunoprevention. An example of this, are the studies on cervical cancer and its relation with the human papilloma virus (HPV), whose interaction is particularly devastating in Mexican women.

Keywords: Allele, haplotype, genotype, locus, polymorphism, ethnic group, MHC, variability, diagnosis, prevention.

Definición de conceptos

Desde el conocimiento del genoma humano en el año 2002 se despertó gran interés en conocer la aplicación de estos conceptos a la vida cotidiana del individuo, particularmente los relacionados con la salud, por lo que conviene la definición de varios conceptos:

- Alelo.- Sinónimo de variante genética; cada individuo tiene dos alelos por cada gen, uno heredado del padre y otro de la madre.
- Haplotype.- Conjunto de alelos heredados en bloque por ubicarse en la misma región cromosómica. Por cada región, cada individuo tiene dos haplotipos, uno heredado del padre y otro de la madre.
- Genotipo.- Conjunto de dos haplotipos.
- Locus.- Sinónimo de gen, sitio.
- Loci.- Plural de locus.
- Polimorfismo.- Se refiere al conjunto de alelos en un mismo gen.
- Grupo étnico.- Aquel individuo que nació en una región geográfica definida al igual que sus últimas dos generaciones, por ejemplo grupo étnico mexicano.

La variabilidad intragrupos a partir de la historia y de los ecosistemas en cada población

Es interesante que el estudio de la variabilidad genética a nivel de DNA revela que la mayor variabilidad ocurre dentro de los grupos y en menor proporción entre los grupos, sea que se estudie el DNA genómico, el DNA mitocondrial, los polimorfismos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), los microsatélites de DNA (*short tandem repeats STRs*) o los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) [1].

De todo el genoma la región más polimórfica se ubica en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21), donde existe un conjunto de más de 300 genes que, en conjunto, se conocen como MHC y que ocupan tan solo un poco más de 4 millones de pares de bases, lo que muestra, además del elevado polimorfismo, también elevada densidad genética. Ejemplo de ello es la Tabla 1 que se refiere a variantes alélicas de los *loci* HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ que codifican glicoproteínas expresadas en la células profesionales presentadoras de antígeno; estos *loci* tienen el nombre de genes clase II del MHC por codificar dímeros (cadena α y cadena β) y tener expresión restringida a células cuya función es la presentación antigénica [2].

También extraordinariamente polimórficas son las moléculas clase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), particularmente el *locus* HLA-B con más de mil alelos y cuya función es la eliminación de agentes infecciosos intracelulares estrictos como los virus.

También es interesante que el polimorfismo de estos genes se incrementó a partir del movimiento de poblaciones y en consecuencia nuevos retos para la eliminación de patógenos, lo que ha generado recombinaciones interalélicas que dan lugar a nuevos alelos, particularmente en sitios relativamente aislados como el continente americano hasta hace apenas 500 años [3]. Por lo anterior, se comprende a partir de estos datos que las poblaciones de América ante el contacto con individuos europeos en el siglo XVI condicionarán la aparición de epidemias devastadoras de múltiples agentes infecciosos como la viruela, la peste y el *cocoliztli* (hantavirus), lo que despobló regiones como Mesoamérica, disminuyendo la población de 22 millones hasta un millón al final de la colonia, pero otras regiones se devastaron hasta en 100%, como las islas del Caribe donde se incorporaron individuos europeos y africanos que hacen que hoy la estructura de población de esta región sea muy diferente a la de la zona continental [4].

Este cuello de botella poblacional está en camino de equilibrio incorporando nuevos genomas, pero el tiempo transcurrido (aproximadamente 500 años) es apenas el inicio si se toma en cuenta que una generación abarca 20-25 años y por lo tanto el número de generaciones hasta nuestros días no son suficientes para diluir el fuerte componente autóctono. Esto se encuentra bien ejemplificado en la Tabla 2 [4].

A lo anterior se añade el efecto de nuevo patógenos y el entorno de ecosistemas extraordinariamente diverso, particularmente de los Trópicos hacia el Ecuador donde la influencia del clima varía con relación a la altura sobre el nivel del mar generando mayor diversidad biológica en agentes infecciosos, plantas, animales y desde luego el ser humano [5]. No sorprende entonces que México sea uno de los focos de mayor diversidad biológica en todo el mundo.

Epidemiología genética

Esta rama del conocimiento suma las herramientas de dos disciplinas médicas de extraordinario dinamismo, por un lado la epidemiología y por otro la genética que, aplicadas al estudio de la enfermedad, permiten identificar variantes genéticas cuya frecuencia es mayor en pacientes con enfermedades autoinmunes si se les compara con las correspondientes frecuencias en individuos sanos pertenecientes al mismo grupo étnico. Lo mismo ocurre con enfermedades infecciosas y neoplásicas, como se muestra en la Tabla 3 [6].

Aplicaciones del genoma en el mexicano

Los conceptos anteriores claramente intervienen en otra nueva disciplina médica conocida como farmacogenómica que sugiere que algunos medicamentos pueden ser más efectivos si el paciente expresa tal o cual gen, o pueden ser tóxicos y generar estados de gravedad si se tiene un alelo en particular. Ejemplo de ello son las reacciones de hipersensibilidad al medicamento antiviral *Abacavir* en pacientes infectados por HIV que son positivos al HLA-57.

Otra aplicación se enfoca en el papel de los nutrimentos como inductores de salud y enfermedad, lo que ha llevado a los conceptos de nutrigenómica, interacción de genes con nutrimentos para conectar vías metabólicas específicas que protejan de enfermedad; y el de nutrigenética que se refiere a la acción concreta de un nutrimento sobre un gen específico, por ejemplo el papel del gen ABC (*ATP binding cassette*) y su influencia en el desarrollo de diabetes *mellitus* en mexicanos.

Otra aplicación es el papel de marcadores genéticos como marcadores diagnósticos y pronósticos de enfermedades a través de varios mecanismos, particularmente interesante es el de semejanza molecular (*molecular mimicry*) entre alelos de los genes MHC y la glicoproteína gp110 del virus de Epstein-Barr en pacientes con artritis reumatoide como se muestra la Tabla 4.

Lo anterior permite ver que en corto plazo habrá fármacos específicos para individuos específicos, que traducirán el camino hacia la medicina individualizada. Lo mismo ocurrirá en el campo de la inmunoprevención a partir de vacunas que serán más efectivas en genomas individuales.

Estudios en este sentido se están realizando en el terreno del cáncer cérvicouterino y su relación con el virus del papiloma humano (VPH), cuya interacción es particularmente devastadora en mujeres mexicanas, para, de esta manera, evitar muchas histerectomías innecesarias [7].

Conclusión

En conclusión el estudio del genoma del mexicano apenas empieza y en los siguientes años revelará sus intrincados secretos que harán muy interesante el ejercicio de la medicina donde las jóvenes generaciones encontrarán el camino a la excelencia intelectual.

Bibliografía

1. Jorde, L. y Wooding, S. (2004) *Nature Genetics Supplement* **36**, S28-33
2. Granados, J. y Yamamoto-Furusho, K. (1996) *Rev. Endocrinol. Nutr.* **1**,6-14
3. Calafell, F. (2003). *Nature genetics.* **33**, 435-436
4. Parra, E.J., Kittles, R.A. y Shiver M.D. (2004) *Nature Genetics Supplement* **36**, S54-60
5. Darvasi A. y Shifman, S.(2005) *Nature Genetics* **37**, 118-119
6. Burton, P.R., et al., (2005) *Lancet* **366**, 941-51
7. Silva-Zolezzi, I., et al., (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 8611-16

Tabla 1. Elevado polimorfismo de los genes clase II

Alelo	Antígeno	Alelo	Antígeno	Alelo	Antígeno
DRA*0101	-	DQA1*0101	-	DPA1*0101	-
DRA*0102	-	DQA1*0102	-	DPA1*0102	-
DRB1*0101	DR1	DQA1*0103	-	DPA1*0103	-
DRB1*0102	DR1	DQA1*0104	-	DPA1*0201	-
DRB1*0103	DR103	DQA1*0201	-	DPA1*02021	-
DRB1*1501	DR15(2)	DQA1*03011	-	DPA1*02022	-
DRB1*1502	DR15(2)	DQA1*03012	-	DPA1*0301	-
DRB1*1503	DR15(2)	DQA1*0302	-	DPA1*0401	-
DRB1*1601	DR16(2)	DQA1*0401	-	DPB1*0101	DPw1
DRB1*1602	DR16(2)	DQA1*0501	-	DPB1*0201	DPw2
DRB1*0301	DR17(3)	DQA1*05011	-	DPB1*02011	DPw2
DRB1*0302	DR18(3)	DQA1*05012	-	DPB1*02012	DPw2
DRB1*0303	DR18(3)	DQA1*05013	-	DPB1*0202	DPw2
DRB1*0401	DR4	DQA1*0601	-	DPB1*0301	DPw3
DRB1*0402	DR4	DQB1*0501	DQ5(1)	DPB1*0401	DPw4
DRB1*0403	DR4	DQB1*0502	DQ5(1)	DPB1*0402	DPw4
DRB1*0404	DR4	DQB1*05031	DQ5(1)	DPB1*0501	DPw5
DRB1*0405	DR4	DQB1*05032	DQ5(1)	DPB1*0601	DPw6
DRB1*0406	DR4	DQB1*0504		DPB1*0801	-
DRB1*0407	DR4	DQB1*0601	DQ6(1)	DPB1*0901	-
DRB1*0408	DR4	DQB1*0602	DQ6(1)	DPB1*1001	-
DRB1*0409	DR4	DQB1*0603	DQ6(1)		-
DRB1*0410	DR4	DQB1*0604	DQ6(1)	DPB1*1101	-
DRB1*0411	DR4	DQB1*0605	DQ6(1)	DPB1*1301	-
DRB1*0412	DR4	DQB1*0606		DPB1*1401	-
DRB1*11011	DR11(5)	DQB1*0201	DQ2(1)	DPB1*1501	-
DRB1*11012	DR11(5)	DQB1*0301	DQ7(3)	DPB1*1601	-
DRB1*1102	DR11(5)	DQB1*0302	DQ8(3)	DPB1*1701	-
DRB1*1103	DR11(5)	DQB1*03031	DQ9(3)	DPB1*1801	-
DRB1*11041	DR11(5)	DQB1*03032	DQ9(3)	DPB1*1901	-
DRB1*11042	DR11(5)	DQB1*0304	DQ7(3)	DPB1*2001	-
DRB1*1105	DR11(5)	DQB1*0401	DQ4	DPB1*2101	-
DRB1*1201	DR12(5)	DQB1*0402	DQ4	DPB1*2201	-

Tabla 2. Asociaciones del alelo específicas en genes de clase II

ESPECIFICIDAD DR	ALELO-DRB		ALELO-DQ		GRUPO ÉTNICO			
	*DRB1	DRB5	*DQA1	*DQB1	Caucásico	Negroide	Mongoloide	
DR3								
	DR17	0301	0101	0501	0201	+	+	
	DR17	0301	0202	0501	0201	+	+	+
	DR18	0302	0101	0401	0402		+	
DR6								
	DR13	1301	0101	0103	0603	+	+	+
		1302	0301	0102	0604	+	+	
		1302	0301	0102	0501	+	+	
		1303	0101	0501	0301	+	+	
		1303	0101	0201	0201		+	
		1305	0101	0201	0201		+	
	DR14							
		1401	0202	0101	0503	+	+	+
		1401	0202	0101	0602		+	
		1402	0101	0501	0301			+
		1403	0101	0501	0301	+		+

Tabla 3. Algunas enfermedades reumáticas asociadas con HLA

Enfermedad	Frecuencia (%)			
	HLA	Pacientes	Controles	RR
Espondilitis Anquilosante	B27	90	9.4	87.4
Enfermedad de Reiter	B27	79	9.4	37.0
Artropatía Psoriática Central	B27	53	9.4	10.7
	BW38	14	1.8	9.1
Artropatía Psoriática Periférica	B27	17	9.4	2.0
	BW38	11	1.8	6.5
Artritis Reumatoide	DR4	50	19.4	4.2
Lupus Eritematoso				
Generalizado	DR3	70	28.2	5.8
Escleroderma	DR5	53	18.0	5.0

Tabla 4. Comparación de secuencias en dr1, subtipos de dr4 y la gp110*

Aminoácido	69	70	71	72	73	74	75	76	77
DR1	Glu	Gln	Arg	Arg	Ala	Ala	Val	Asp	Thr
Dw4	Glu	Gln	Lys	Arg	Ala	Ala	Val	Asp	Thr
Dw14	Glu	Gln	Arg	Arg	Ala	Ala	Val	Asp	Thr
Dw15	Glu	Gln	Arg	Arg	Ala	Ala	Val	Asp	Thr
	807								815
gp 110*	Glu	Gln	Lys	Arg	Ala	Ala	Gln	Arg	Ala

*glicoproteína de la cápside del virus Epstein -Barr

Semblanza del Dr. Julio Granados Arriola



El Dr. Julio Granados Arriola es Médico Cirujano egresado de la Facultad de Medicina de la UNAM con especialidad en Medicina interna por el Hospital "20 de Noviembre". Realizó un posgrado en Inmunogenética en el Dana Farber Cancer Institute de la Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, EUA. Tiene, asimismo, un Maestría en Ciencias Médicas por la Facultad de Medicina UNAM. Es investigador nivel III del Sistema Nacional de Investigadores y miembro de la Academia Nacional de Medicina. Actualmente es Jefe de la División de Inmunogenética del Departamento de Transplantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ).



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 115-130. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

TRANSPORTE DE RNA EN NEURONAS: EL TRANSCRIPTOMA AXONAL, ORIGEN Y FUNCIÓN

NEURONAL TRANSPORT OF RNA: THE ORIGIN AND FUNCTION OF AXONAL TRANSCRIPTOME

José R. Sotelo Silveira^{1,3}, José R. Sotelo Sosa²

¹Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

²Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, ³Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura. Montevideo, Uruguay.

sotelojos@gmail.com

Resumen

Las células neuronales presentan una polarización evidente en donde vastos territorios citoplásmicos como el dendrítico o axonal, pueden significar mas de un 95% del volumen celular. El mantenimiento de estos territorios implican que el transporte y el recambio de proteínas sea relevante en la fisiología neuronal. Además del transporte axonal rápido de proteínas, se propuso que existía la posibilidad de sintetizar al menos un determinado numero de proteínas axonales. Esto ha sido demostrado mediante diversas aproximaciones y modelos experimentales evidenciando neosíntesis de proteínas en axones, conos de crecimiento y terminales nerviosas. Varias líneas de evidencia son consistentes en la detección de RNA ribosomal, mRNAs, tRNAs, microRNAs y proteínas regulatorias de los microRNAs (complejo RISC). La neosíntesis de proteínas es regulada por diferentes cascadas de señalamiento intracelular, incluida la vía mTOR. El origen del RNA axonal es atribuido al soma neuronal, pero existen evidencias recientes que apoyan una transferencia de RNA célula a célula desde la glía de Schwann hacia el axón. Ambos transportes el intracelular y el intercelular serán presentados y discutidas en contextos axonales normales y regenerativos.

Palabras clave: Axón, traducción local, miRNAs, mRNAs, mTOR, transcriptoma, 3'UTR.

Abstract

Neurons are highly polarized cells, often with very long processes, which can comprise up to 95% of the cytoplasm. This raises the issue of transporting and turnover of axonal proteins. In addition to fast axonal transport, axonal translation has been proposed to be responsible for producing at least some axonal proteins. In multiple experimental models, local synthesis of several proteins has been demonstrated in axons, growth cones, and nerve terminals. Multiple lines of evidence are consistent with the existence of axonal rRNAs, mRNAs, tRNAs, micro RNAs and micro RNA regulatory proteins (RISC complex). Multiple signaling pathways, including mTOR, may regulate axonal translation. The origin of axonal RNAs is often attributed to transport from the neuronal soma, but evidence supporting cell-to-cell transport from Schwann cells to axons as a source of at least some axonal RNAs is emerging. This intercellular transport will be discussed in the context of normal and regenerative conditions.

Keywords: Axon, local translation, miRNAs, mRNAs, mTOR, transcriptome, 3'UTR.

Introducción

Las neuronas, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, poseen características dimensionales muy particulares. En la gran gama de morfologías hasta hoy observadas, la característica común sobresaliente es que el soma neuronal solo constituye menos de un 5% del volumen citoplásmico de toda célula. Estas neuronas pueden tener un árbol dendrítico o un axón que representa el 95% o más del volumen celular [1]; por ejemplo, en el caso de axones pertenecientes a motoneuronas en un ser humano, estamos hablando de un largo de aproximadamente un metro de longitud. Esto representa una carga metabólica constante e importante sobre la maquinaria biosintética localizada en el pericarion neuronal, que debe abastecer de proteínas y otros componentes subcelulares a un vasto territorio citoplásmico durante toda la vida de dichas neuronas. Esto equivaldría, de acuerdo a la longevidad promedio de nuestra especie, a aproximadamente setenta años de mantenimiento funcional de toda la estructura celular.

Dentro de los mecanismos que permiten que esta estructura se mantenga se encuentra el transporte axonal rápido y lento, ambos operantes en dendritas y axones. La existencia de mecanismos de transporte rápidamente estableció la base logística del mantenimiento de territorios citoplásmicos neuronales. En un principio el modelo neuronal era absolutamente centralista en cuanto a la fabricación de proteínas localizada únicamente en el soma neuronal. Sin embargo, en dendritas fue claro tempranamente que parte de los elementos transportados hacia las regiones subsinápticas incluían a la maquinaria de traducción [2]. En el caso de los axones, la distribución de la maquinaria traduccional no fue evidente en las primeras caracterizaciones ultraestructurales [3] y, por muchos años, se asumió que no existían en el territorio axonal. Por otro lado, experimentos realizados a mediados del siglo pasado, fueron aportando evidencias de que existían componentes de la maquinaria traduccional localizados axonalmente en diferentes modelos neuronales [4]. A partir de ese punto, distintos investigadores estudiaron el problema de la capacidad de síntesis de proteínas axonales que, hoy en día, comienza a ser aceptada [5-8]. Esto tiene implicaciones importantes en la comprensión de la fisiología neuronal, ya que es diferente analizar el mantenimiento axonal y su capacidad de respuesta frente a situaciones patológicas o de daño, si es que se dispone o no de mecanismos rápidos y locales de renovación de proteínas. Más aún, actualmente se propone que la glía asociada al axón es una fuente adicional de maquinaria traduccional así como de

mRNA, aumentando el potencial de respuesta, así como la complejidad del fenómeno de mantenimiento axonal localizado. En esta revisión se pretende plasmar una puesta a punto del conocimiento del conjunto o complejidad del RNA axonal (el transcriptoma axonal) y analizar las evidencias experimentales que soportan la idea de la transferencia de RNA desde la célula glial al compartimento axonal.

Partículas ribonucleoprotéicas (RNPs) y ribosomas en axones: evidencias ultraestructurales

Las observaciones ultraestructurales sobre la distribución de ribosomas en el territorio axonal de vertebrados superiores tienen dos grandes vertientes. Por un lado, estudios clásicos revelaron que la maquinaria traduccional se encontraba fácilmente al observar axones de neuronas en crecimiento en etapas embrionarias [9-13] o los segmentos iniciales de axones mielínicos maduros [14]. Sin embargo, por otro lado, el vasto territorio axonal combinado con su pequeño diámetro, en el caso de axones mielínicos largos, fue un obstáculo para que los esfuerzos de caracterización ultraestructural del axón rindieran sus frutos. En una serie de trabajos muy elegantes, Zelena fue capaz de identificar grupos de cuatro a cinco ribosomas en axones mielínicos [15-17]. En estos trabajos adelantados para su época, logró establecer que existía una relación cercana entre los ribosomas y los microtúbulos del citoesqueleto, así como la presencia de acúmulos de ribosomas en regiones cercanas a los nodos de Ranvier.

La aproximación ultraestructural posee una enorme resolución, pero no permite observar en forma rápida regiones extensas de territorio axonal. Trabajos pioneros de microdissección de axones realizados por el Dr. Koenig, resolvieron ese problema al lograr diseccionar axones motores para poder observarlos mediante microscopía óptica y realizar además análisis bioquímicos sobre la presencia de RNA en el axón [18]. Utilizando microscopía de barrido láser confocal y colorantes con alta afinidad para ácidos nucleicos como el YOYO-1, Koenig y Martin lograron identificar por primera vez, en regiones internodales, acúmulos de ribosomas y ácidos nucleicos, localizados en el citoesqueleto cortical de actina [19]. Estos nuevos dominios axonales fueron llamados Placas Periaxoplásmicas Ribosomales o PARPS y fueron encontrados tanto en axones del sistema nervioso central de peces óseos como en axones mielínicos motores y sensoriales adultos de ratón, rata y conejo (Figura 1) [20].

La presencia de ribosomas en regiones axonales corticales e internodales fue confirmada por estudios ultraestructurales utilizando anticuerpos que reconocían varias proteínas ribosomales [21] (Figura 2) y al analizar cientos de secciones ultrafinas seriadas de segmentos iniciales de axones motores mediante microscopía electrónica de transmisión en [22,23].

Al lograr identificar donde se concentraba el RNA en el axón, fue posible realizar estudios sobre dichos dominios en detalle. Si estos dominios forman parte activa de sistemas de transporte y localización de RNA en el axón, deberían poseer elementos de la maquinaria de transporte de los mismos. Mediante estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ*, se demostró la presencia de motores moleculares como kinesina II y miosina Va [24], así como el mRNA de la β -actina junto a su proteína de unión ZBP-1 [25]. También se detectó el mensajero de la Miosina Va (ver review en Traffic, 2006). Estos resultados indicaron por primera vez que un mRNA podía estar localizado en regiones específicas del axón, pero extendieron resultados previos que indicaban que era posible detectar mRNAs codificantes para neurofilamentos en la zona cortical de axones mielínicos del nervio ciático en regeneración [26,27].

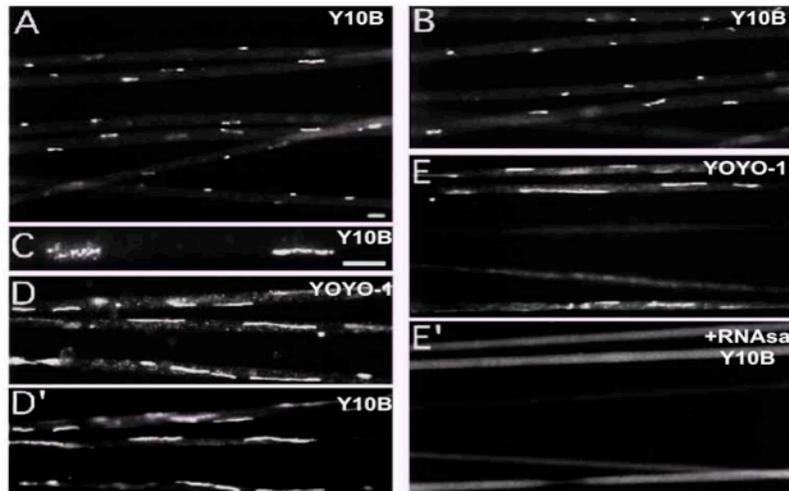


Figura 1. Placas ribosomales periaxoplásmicas en axones motores mielínicos. Los ribosomas, evidenciados con el anticuerpo monoclonal Y10B (A, B, C) se observan agrupados en regiones discretas a lo largo de los axones motores. Estas mismas regiones se tiñen con YOYO-1(D, D') y son sensibles al tratamiento con RNAsas (E, E'). Reproducido de Koenig et al [20] gracias a la cortesía de *Journal of Neuroscience*.

Mecanismos de transporte de RNA y regulación de la traducción en el axón

Las evidencias experimentales apuntan a que existen mRNA y una maquinaria traduccional en regiones axonales alejadas del soma neuronal, lo que conlleva a la formulación de preguntas que atañen a cuáles son los mecanismos utilizados para lograr esta localización espacial en particular. En varios sistemas celulares la localización de RNA y la regulación de la traducción se encuentran relacionados y requieren de mecanismos finamente organizados. En los mRNA, las señales en *cis* responsables de la localización se encuentran principalmente sobre el extremo 3' no traducido o 3'UTR y fueron denominadas "códigos postales" (del inglés "zipcodes") [28]. Estas secuencias presentan características diversas e interaccionan en forma específica con una variedad de factores proteicos o "Trans actin factors" (TAF). Algunos de ellos se unen directamente a las regiones del UTR, otros forman parte de los complejos de unión a estos códigos postales y un tercer grupo son proteínas motoras que movilizan los complejos de RNA y proteínas. El transporte de los mismos utiliza tanto a los microtúbulos como los microfilamentos y los motores asociados a cada red en particular: kinesinas y dineínas en el caso de microtúbulos y miosinas para los filamentos de actina. Se piensa que los microtúbulos son utilizados en el caso de transporte de largo alcance y la red de actina para movimientos cortos y anclaje [29]. El mRNA se transporta, en general, en complejos macromoleculares llamados Ribonucleopartículas (RNPs) o Gránulos de RNA.

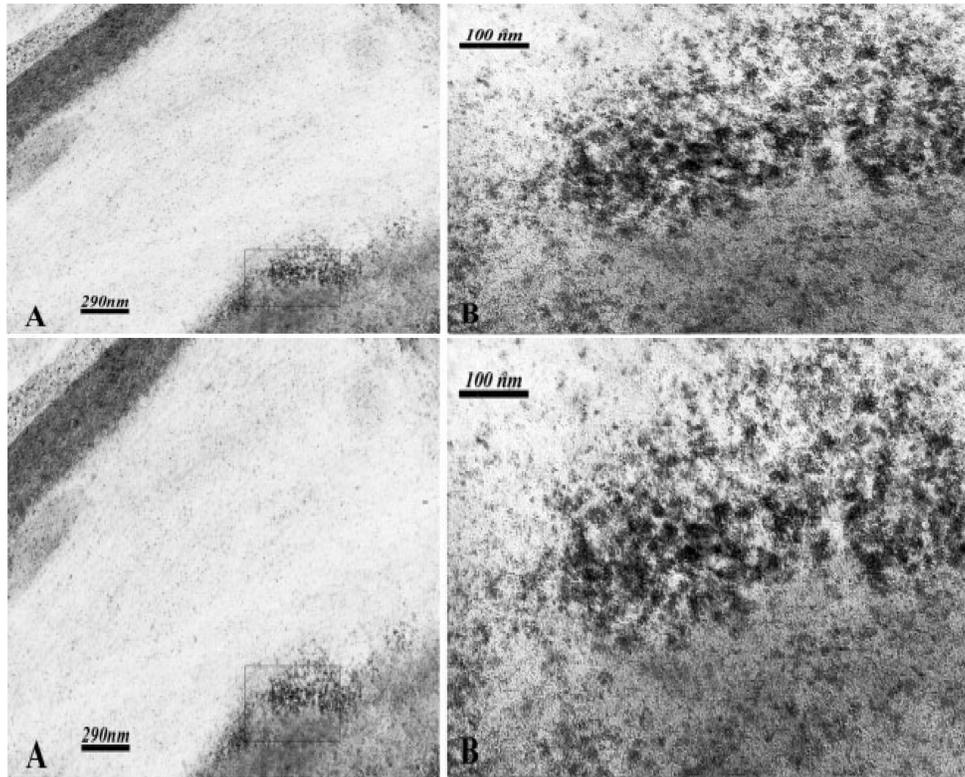


Figura 2. Ribosomas en axones mielínicos a nivel ultraestructural. En el panel superior se observan ribosomas en regiones axonales corticales mediante microscopía electrónica convencional. El recuadro en la figura izquierda se muestra a mayor aumento en el panel superior derecho. La figura inferior muestra una microscopía electrónica con tinción anti-ribosomas con peroxidasa (zonas electrón densas) sin contra-tinciones con metales pesados. En el recuadro se observa una región axonal cortical a gran aumento donde se acumula la inmunoreacción para ribosomas. Tomado de Kun et al [21], cortesía de Wiley-Blackwell.

Uno de los casos más estudiados de transporte de RNA mensajero es el de la β -actina. Inicialmente se caracterizó una secuencia señal en el 3'UTR de 52 nucleótidos y una proteína de unión denominada Zip code binding protein o ZBP1 capaz de unirse a ella y mediar la localización de este mRNA hacia el borde celular de un fibroblastos en cultivo [30-32]. En neuronas en cultivo, hoy se conoce que a esta señal no solo se une ZBP1 sino que también colaboran ZBP2 y hnRNP-R. En este caso el ensamblado de este complejo es un requerimiento para que suceda la translocación del mRNA de la β -actina [33,34]. A su vez, la unión de ZBP1 al extremo 3'UTR de este mensajero tiene un efecto represor de la traducción del mismo, tanto en fibroblastos [35] como en neuronas [36]. En neuronas fue posible demostrar que la adición de BDNF inducía la fosforilación de ZBP1, activando la síntesis de la β -actina e influyendo como consecuencia en la habilidad del cono de crecimiento para cambiar su dirección de crecimiento [36]. En lo referente a hnRNP-R, todavía se desconoce su función precisa, aunque se ha demostrado la unión directa al mRNA de la β -actina [34] y su interacción con la proteína "survival motor neuron" (SMN) causante de la enfermedad "Spinal Muscular Atrophy" (SMA). SMN se asocia al mRNA de la β -actina [37] y modula la presencia del mismo en los conos de crecimiento en neuronas cultivadas in vitro [38] con lo cual queda claro que las implicaciones de este sistema de regulación podrían ser importantes tanto en situaciones normales como patológicas.

El tráfico y/o transporte de la β -actina también ha sido estudiado en neuronas y sirve como ejemplo para ilustrar como podrían transportarse mRNA en neuronas. El ensamblaje de la partícula ZBP1 requeriría de ZBP2 durante la transcripción en el compartimento nuclear [39]. Una vez en el citoplasma, se ha demostrado que las partículas ribonucleoprotéicas conteniendo este mRNA se transportan bidireccionalmente en axones en cultivo, indicando la utilización de sistemas de transporte dependiente de microtúbulos [33], involucrando quizás a los motores moleculares como Kinesina y Dineína. En axones maduros y mielínicos (axón gigante de Mauthner y axones motores de rata) fue posible encontrar el mensajero codificante para β -actina en las Placas periaxoplásmicas (Figura 3), junto con proteínas motoras como Kinesina II, Miosina Va [24] y la proteína ZBP1 [25] (Figura 4), indicando que es posible no solo el tráfico axonal de mRNA a largas distancias utilizando microtúbulos, sino que probablemente se utilicen mecanismos de localización y/o anclaje en el citoesqueleto de actina [6].

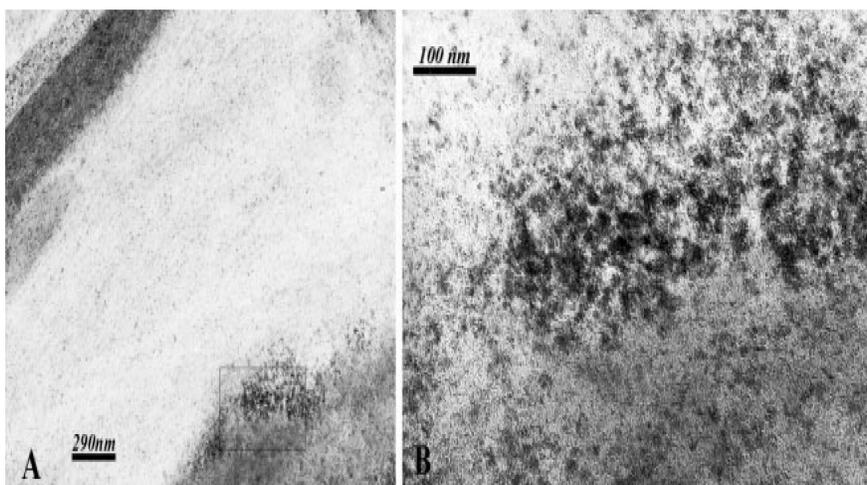


Figura 3. El mensajero de la β -actina se encuentra en las placas periaxoplásmicas (PARPs) en diferentes axones. Desde A a C se observan axones de Mauthner del pez dorado (*Carassius auratus*), de D a G se observan axones motores mielínicos de mamíferos. A, B, D, E, F, son hibridaciones *in situ* fluorescentes para detectar el mRNA de la β -actina. C y G son los respectivos controles con sonda sentido. El panel izquierdo muestra los axones mediante contraste de fases, donde las PARPs se señalan con líneas punteadas. El panel central muestra la señal de hibridación y el panel derecho muestra la superposición de los paneles izquierdo y central para mostrar cómo se concentra la señal sobre las PARPs. Tomado de Sotelo-Silveira y cols [25], cortesía de Wiley y sons Ltd.

Es relevante resaltar que la hipótesis general de que el extremo 3' no traducido es importante para la localización de mRNA en axones. Se ha verificado en el caso de otros mRNAs, utilizando modelos de cultivos neuronales *in vitro*. Tal es el caso del mRNA codificante para la proteína axonal Tau, identificándose una región de 240pb responsable de la localización del mismo [40,41], así como para el mRNA codificante para Impa1 en axones simpáticos [42].

En líneas generales y combinando información sobre lo que se conoce de gránulos de RNA en neuronas [43], se puede decir que éstos contienen mRNA, ribosomas y una gran variedad de proteínas. Se piensa que los mRNAs contenidos en estos gránulos estarían traduccionalmente reprimidos en la fase de elongación de la traducción, pero que en otros casos, en donde la represión ocurre durante la iniciación, los gránulos no incluirían ribosomas [44]. Para ambos casos se propone que estos gránulos participan en el transporte de RNA, pero que a su vez pueden ser reservorios de los mismos, liberándolos para ser traducidos, en los momentos apropiados [45].

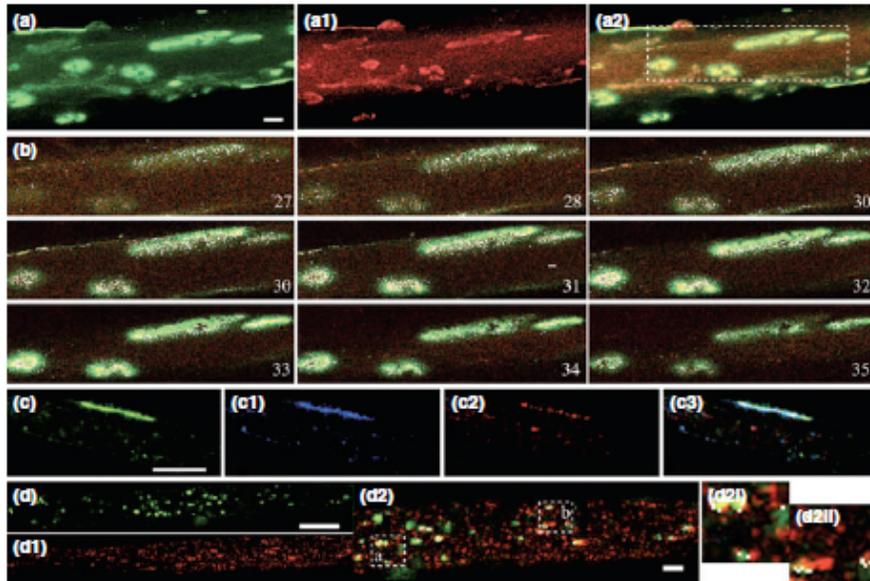


Figura 4. ZBP1, la proteína de unión al mRNA de la β -actina se encuentra en las placas periaxoplásmicas (PARPs) de diferentes axones. (a) y (b) muestran axones de Mauthner, mientras que C y D muestran axones motores de rata. En (a) se observan PARPs teñidas con YOYO-1 (verde) y en (a1) se observa la localización de ZBP1 (rojo). La colocalización se observa en (a2). En (b) se muestra la señal para ZBP1 a lo largo de varias secciones confocales. En (c) se observa la colocalización de RNA (YOYO-1, verde, c), ribosomas (azul, c1) y ZBP1 (rojo, c2), o la superposición de dichas imágenes (c3). En (d) se observa la presencia de gránulos de RNA en el centro del axón, conteniendo RNA (verde, d), ZBP1 (rojo, d1) o la superposición (d2) de ambas imágenes. (d2I) y (d2II) muestran dos tipos de gránulos diferentes. Tomado de Sotelo Silveira y cols [25], cortesía de Wiley y sons Ltd.

El control de la traducción en axones quizás sea el nexo entre los gránulos de mRNA y la traducción de los mismos a través de por lo menos varias vías de señalización. Nuestro grupo ha demostrado la participación de la vía del AMP cíclico y de la integridad del citoesqueleto de actina fibrilar [25] (Figura 5).

Cabe resaltar que aunque la atención de la investigación se centra en las vías de señalamiento intracelular clásicas, resulta cada vez más claro que el citoesqueleto es un regulador prominente de la síntesis de proteínas en general [46]. Otros grupos han aportado evidencias sobre la participación de la vía del blanco de rapamicina (mTOR). Esta vía, es crucial en la regulación de la biogénesis de ribosomas y de la traducción en si misma a través de la fosforilación de varios sustratos [47,48]. La inhibición de mTOR por rapamicina disminuye la incorporación de aminoácidos marcados radioactivamente en proteínas axonales y reduce la formación de conos de crecimiento en cultivos de neuronas sensoriales o retinianas luego de realizar la axotomía [49]. Es muy interesante resaltar que la eliminación de PTEN, un regulador negativo de la vía mTOR, tiene un efecto promotor en la regeneración *in vivo* [50]. Aunque la delección de PTEN fue realizada globalmente, es claro que podría estar afectando la traducción de proteínas axonales, siendo esto una clara indicación de que los mecanismos de regeneración podrían depender de la modulación general y local de la síntesis protéica axonal.

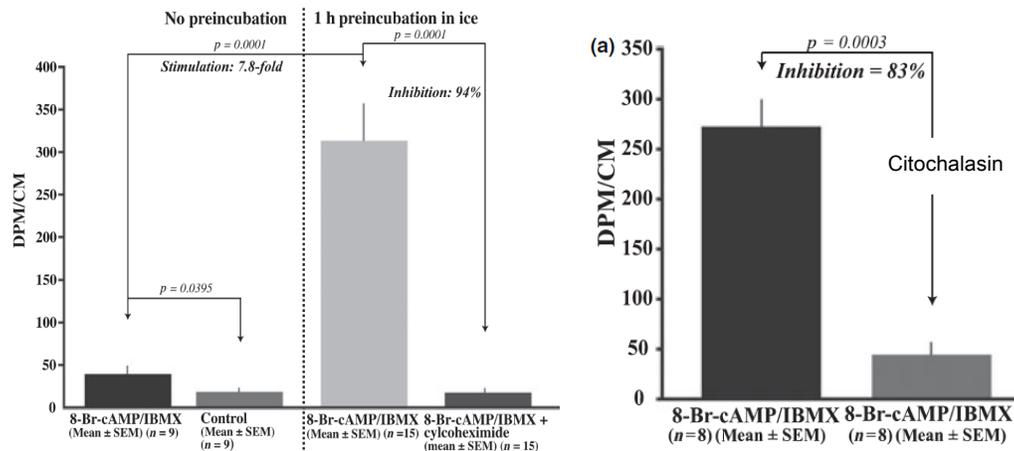


Figura 5. La síntesis de proteínas axonales es modulada por AMP cíclico y la integridad del citoesqueleto de actina. El panel izquierdo muestra que el AMPc (especialmente cuando es pre-incubado, barra gris clara) estimula la síntesis de proteínas axonales. La inclusión de cicloheximida demuestra que la síntesis de proteínas es citoplásmica y no mitocondrial. El panel derecho muestra que el desensamblaje de la actina-F mediante la aplicación de Citocalasina en axones estimulados por AMPc disminuye la capacidad de sintetizar proteínas por parte de la maquinaria axonal. Tomado de Sotelo Silveira y cols [25], cortesía de Wiley y sons Ltd.

El transcriptoma axonal

Casi todas las especies de RNA conocidas han sido descritas, utilizando diferentes modelos, en el territorio citoplásmico axonal. En la era pre-genómica, el trabajo realizado se centraba principalmente en la búsqueda de ácidos nucleicos claves que contribuyeran a demostrar que existía la traducción localizada de mRNA en axones. En la era post genoma, los métodos de detección masiva de ácidos nucleicos han comenzado a dar frutos inesperados que indican, al menos en axones inmaduros en cultivos *in vitro*, la presencia y/o transporte de mRNA de funciones variadas.

Inicialmente se buscaron mRNA codificantes para proteínas del citoesqueleto, cuya función en procesos de mantenimiento y regeneración axonal fuese relevante. Nuestro grupo fue el primero en demostrar que los mRNA codificantes para los neurofilamentos estaban presentes en axones de nervios ciáticos normales y lesionados [26,27]. En dichos trabajos también se demostraba la traducción local de los mismos durante la regeneración, indicando por primera vez que estas proteínas citoesqueléticas neuronales, usualmente transportadas en forma muy lenta desde el soma neuronal, eran sintetizadas localmente para quizás contribuir al mantenimiento y remodelación del axón durante la regeneración. Parte de estos resultados fueron confirmados por trabajos que estudiaban la expresión de neurofilamentos desde otros ángulos interpretativos [51,52]. Además de que la lesión estimulaba la síntesis de estos mRNAs, fue muy relevante detectar la distribución, mediante hibridización *in situ*, del mRNA en sí. Para nuestro asombro, este mRNA neuro-específico fue observado en dos lugares principalmente: en la célula de Schwann y en el axón que ella envolvía. Esto, como veremos más adelante, sería uno de los primeros indicativos de que la célula de Schwann estaba contribuyendo con mRNA de relevancia funcional para el axón [27].

Los primeros axones que fueron utilizados para estudiar la composición completa de transcritos presentes fue el axón gigante de calamar por el grupo dirigido por el científico napolitano Antonio Giuditta [53]. Las bibliotecas preparadas generaron los primeros datos de que el axón contenía una gran variedad de mRNAs (más de 100), incluyendo claramente moléculas

que codificaban para cosas diferentes que el citoesqueleto. Aunque la distinción entre axones de invertebrados y vertebrados es clara, parece importante que en lo que se refiere a los mRNAs axonales, éstos serían más parecidos de lo que originalmente se pensaba. Como mencionaremos más adelante, utilizando análisis de transcriptomas por microarreglos de extractos de axones inmaduros en cultivos, se ha comenzado a caracterizar la composición completa del transcriptoma axonal. Antes de mencionar esos datos, es importante destacar las observaciones que se dedican en forma individual a caracterizar la presencia y función de distintos RNA en diversos modelos.

El caso de la β -actina, como se menciona anteriormente, es el más estudiado, y su presencia y traducción se ha demostrado en varios modelos *in vitro* e *in vivo*, tanto en axones inmaduros en cultivo como axones mielínicos adultos [6,54]. A su vez, mRNAs codificantes para la tubulina alfa y beta, así como para las proteínas asociadas a los microtúbulos y sus motores moleculares, fueron encontrados en axones de neuronas en cultivo [55-58]. La funcionalidad del mRNA de la beta tubulina fue demostrada en varios sistemas donde se observó la traducción del mismo [57,59,60]. El grupo del Dr. Kaplan demostró que en el caso de las mitocondrias axonales, la síntesis de proteínas mitocondriales ocurría en el territorio axonal y era necesaria para el funcionamiento de la misma [61,62]. En particular, la inhibición de la traslocación hacia el axón del mRNA codificante para la subunidad IV de la citocromo c oxidasa, reduce el crecimiento axonal en neuronas simpáticas en cultivo [63]. Es interesante destacar que el grupo de Jeffrey Twiss ha identificado la presencia de RNA codificante para proteínas cuya localización se encuentra en la membrana plasmática [55]. Para la correcta síntesis de las mismas se necesitaría la maquinaria correspondiente del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, lo cual hasta hoy solo ha sido demostrado en axones de neuronas en cultivo [64].

Muy recientemente, mediante la combinación del uso de cultivos compartimentalizados o captura de fragmentos neuronales (axones y conos de crecimiento) y mediante el uso de lasers y métodos genómicos para monitorear la expresión génica, los grupos de Holt, Fawcett y Riccio avanzaron en la caracterización del transcriptoma de axones en cultivo de diferentes especies y estadios del desarrollo [42,57,58]. Estos datos extienden estudios proteómicos realizados por Twiss y colaboradores [65] ya que aumentan el conocimiento de los mRNAs transportados hacia el axón. Varias son las facetas más interesantes de estas observaciones. Por un lado se logra observar que existe una distribución diferencial de mRNA entre el cono de crecimiento y el axón en sí mismo, y entre diferentes estadios del desarrollo [58]. Los axones derivados de neuronas embrionarias tenían mayor proporción de mRNA relacionados con funciones de crecimiento, mientras que los adultos estaban enriquecidos en moléculas relacionadas con la recepción de estímulos sensoriales [57]. Por último, utilizando la técnica SAGE, Riccio y colaboradores, en axones simpáticos en cultivo, identifican que el mRNA para la mio-inositol monofosfatasa 1 (IMPA1) se encuentra localizado en los mismos. Llama la atención, que esta enzima regula el ciclo del inositol, el blanco principal del litio en neuronas [42], implicándose entonces al transporte de mRNA hacia el axón y su síntesis local como un posible blanco terapéutico. Tomando en conjunto estos datos es cada vez más claro, al menos para neuronas en cultivo *in vitro*, que las vías metabólicas representadas en las poblaciones de mRNA descritas involucran moldes de traducción para receptores, aparato de síntesis proteica, fosforilación oxidativa, cáncer, enfermedades neurológicas y señalamiento intracelular entre otros. Estos hallazgos nos dirigen a proponer que el transcriptoma axonal está altamente regulado y que su funcionalidad será específica para diferentes grupos de neuronas.

La regulación de la traducción del transcriptoma axonal, como mencionábamos previamente, podría involucrar vías como las del blanco de Rapamicina, pero a su vez, existe un componente del transcriptoma que sería también muy importante en la regulación de la misma: los micro RNAs (miRNAs) [66,67]. Analizando los axones de neuronas simpáticas en cultivo, se han identificado la presencia de miRNAs [67-70]. El grupo dirigido por Barry Kaplan llegó a identificar más de cien miRNA diferentes, donde al menos cinco de ellos se encontraban relativamente enriquecidos en el territorio axonal. Los análisis *in silico* para identificar blancos

tentativos de estos miRNAs evidencian que varios mRNAs, previamente identificados en el compartimento axonal, podrían ser blanco de los miRNA axonales. Experimentos realizados *in vivo* por Murashov y colegas, han demostrado que la vía de RNA de interferencia se encuentra activa en axones del nervio ciático [71].

La célula de Schwann como fuente alternativa del RNA axonal

La mayoría de las observaciones mostradas previamente fueron obtenidas en cultivos neuronales *in vitro* sin la presencia de células de Schwann en el mismo. En estos modelos es sencillo definir el origen de los mRNA localizados ya que existe una sola fuente, el soma neuronal. Por otro lado, la detección y localización de mRNA en axones *in vivo* [25] no demuestra el origen del mismo. Para demostrar la conexión causal entre el origen y la localización final axonal se debe recurrir a estrategias, que *in vivo*, pueden resultar más laboriosas. Un caso claro donde se puede verificar el origen somático de un RNA particular *in vivo*, fue descrito por Muslimov y cols [72]. En estos experimentos el RNA no codificante BC1 (marcado radioactivamente) fue inyectado en el soma de la neurona de Mauthner y luego detectado en el axón a varios milímetros de distancia. La fina colaboración funcional y estructural entre las células mielinizantes gliales y los axones que ellas mismas recubren ha sugerido desde hace ya varias décadas que estas dos células interactúan en muchos niveles y formas. A continuación repasaremos evidencias que indican que las células de Schwann podrían ser el origen de los ribosomas y los mRNAs encontrados en el axón.

Las primeras evidencias de transferencia de RNA entre la glía y el axón fueron observadas *in vivo* mediante autorradiografía cuantitativa en axones de nervio ciático de rata lesionado, utilizando uridina tritiada como precursor del RNA [73] (Figura 6). En este modelo se logró demostrar que el RNA sintetizado localmente en la célula de Schwann (evitando específicamente la marcación de RNA en los somas neuronales, por distancia y/o descentralización) era detectado por autorradiografía en el axón.

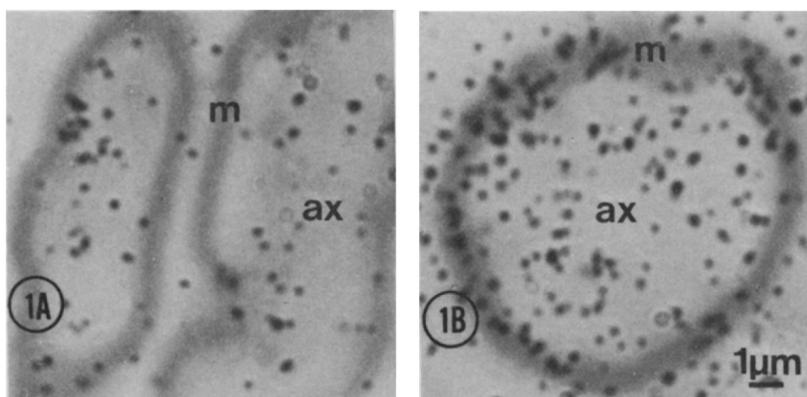


Figura 6. Primeras evidencias de la existencia de la transferencia de RNA entre la célula de Schwann y el axón. En el panel 1A, se observa la detección de RNA marcado radioactivamente mediante autorradiografía. Aquí las fibras del nervio ciático fueron incubadas con Uridina tritiada evitando el marcaje del soma neuronal respectivo. El RNA sintetizado por la célula de Schwann fue detectado en el axón (ax), que aquí se evidencia por estar rodeado de la mielina (m). En el panel 1B se muestra el resultado de la incubación con aminoácidos marcados radioactivamente, para observar la capacidad de síntesis de proteínas de la unidad glía-axón. Tomado de Benech et al [73], cortesía de Elsevier Ltd.

Estos resultados fueron confirmados y extendidos utilizando el axón gigante de calamar. En estos ensayos se incubaban fibras gigantes, aisladas del soma neuronal, con precursores

radioactivos del RNA, lo que permitía coleccionar RNA neosintetizado en el axoplasma [74]. Estos RNAs fueron identificados en mayor detalle como rRNA, tRNA y mRNA [75] e incluso, la transferencia de los mismos podía ser regulada [76,77]. Es importante mencionar que previo a todos estos resultados, Lasek proponía que existía transferencia de proteínas neosintetizadas desde la glía hacia el axón [78].

Analizando la posibilidad de que las proteínas componentes de los filamentos intermedios neuronales, los neurofilamentos, fuesen sintetizados localmente en axones mielínicos de ratas adultas, se encontraron evidencias de que dichos mRNAs también eran sintetizados en la célula de Schwann [27]. En estos estudios, el mRNA codificante para el neurofilamento pequeño fue encontrado en la zona perinuclear de la célula de Schwann, en el límite entre dicha célula y el axón y en el axoplasma. Para nosotros, esto fue un indicio de que el posible origen de un mRNA específico neuronal fuese la célula de Schwann. La presencia de estos mRNAs en la célula de Schwann fue confirmada por otros investigadores [51,52]. Ya que estos filamentos intermedios cumplen su función únicamente en ensamblado del citoesqueleto neuronal, nuestra interpretación de estos resultados nos dirigió aún más a estudiar la posibilidad de una transferencia intercelular de RNA entre estas dos células. Partiendo de los resultados previos [73], se comenzó a utilizar bromo-uridina (BrU) para seguir con mayor definición el proceso de transferencia. Resultados aún no publicados (Sotelo y cols), utilizando microscopía confocal y marcaje con BrU, demostraron claramente que existe transferencia de RNA y que ocurre principalmente en los nodos de Ranvier, quizás, transportando por ejemplo a los neurofilamentos (Figura 7).

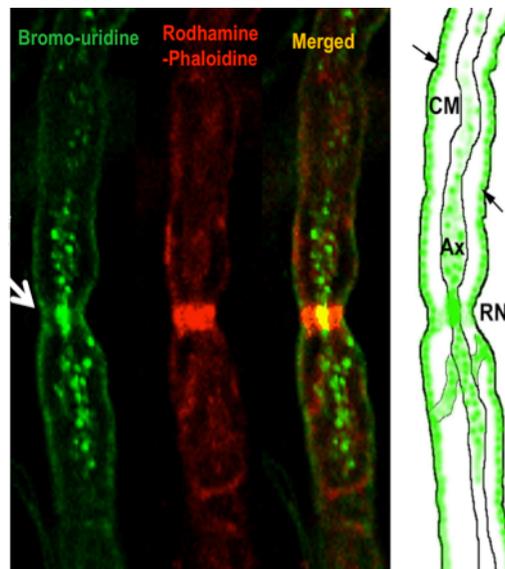


Figura 7. Transferencia de RNA hacia desde la glía al axón. La fibra nerviosa observada fue incubada descentralizada con Bromo-Uridina. La única fuente posible de RNA es la célula de Schwann y el RNA sintetizado se detecta en ella (delgadas líneas verdes del citoplasma externo de la célula de Schwann) y en el axón (panel izquierdo). El panel central izquierdo muestra la tinción del citoesqueleto de Actina con Rodamina-Faloidina. El nodo de Ranvier se señala con una flecha. El panel central derecho muestra la superposiciones de ambas tinciones y el panel derecho muestra un esquema que resalta los principales resultados (CM: mielina compacta, RN: nodo de ranvier, Ax: axón).

Si esta transferencia estuviera existiendo, tendrían que existir huellas ultraestructurales de la misma, por ejemplo, detectar ribonucleopartículas o ribosomas en fases del transporte. Evidencias que apoyan esta teoría provienen de distintas aproximaciones ultraestructurales

como microscopía electrónica convencional [22,23], inmunomicroscopía electrónica para proteínas ribosomales [21,79] (Figura 8) y ribosomas conteniendo fusiones con GFP en ratones mutantes con degeneración valeriana lenta o WLD [80].

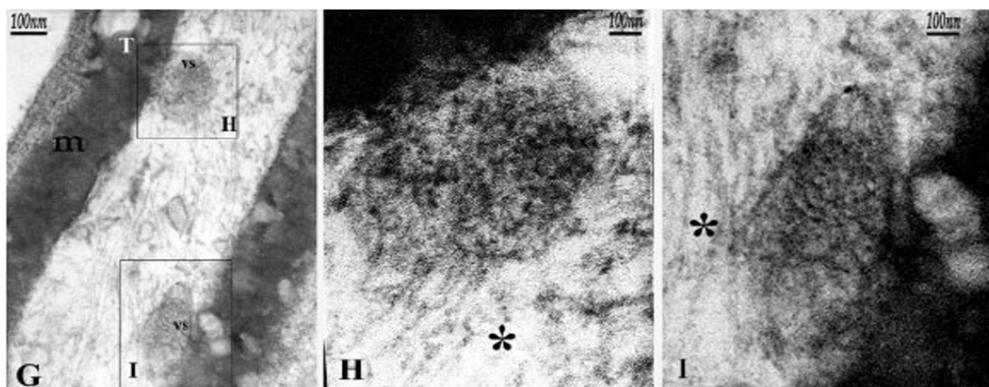


Figura 8. Visión ultraestructural del posible mecanismo de transferencia. La figura muestra una Microscopía Electrónica Convencional (G) donde se pueden observar dos vesículas (H e I) en territorio axonal pero conectadas con la vaina de mielina. Los mismos recuadros se pueden observar en H e I a mayor magnificación. Cabe resaltar la presencia de gránulos de RNA (posiblemente ribosomas) en estas estructuras tipo vesículas. Tomado de Kun et al [21] cortesía de Wiley y Sons Ltd.

Estas observaciones tomadas en conjunto no solo apoyan el transporte intercelular de ribosomas, sino que implican un sistema vesicular como parte esencial del mismo. En cuanto al mecanismo molecular subyacente a la transferencia en sí, es sumamente interesante especular en vista de procesos de transferencia célula a célula presentes en diversos modelos biológicos de estudio. Un ejemplo notorio es el descubrimiento de que los exosomas están involucrados en el transporte intercelular de macromoléculas como lípidos, proteínas y material genético de varios tipos [81]. En el sistema nervioso, exosomas derivados de glías, contienen DNA mitocondrial [82] y mRNA [83]. Otro ejemplo conocido involucra la formación de túbulos de 50 a 200 nm de diámetro llamados “nanotubos”. Estas estructuras son ricas en actina tipo F y miosina Va, y participan en la traslocación de organelos y proteínas de membrana desde una célula a su destino [84]. Los nanotubos o estructuras similares han sido detectadas en una variedad de células *in vitro*, mientras que, utilizando microscopía electrónica por criofractura, se han descrito túbulos de diámetros similares en las regiones internodales de nervios ciáticos de mamíferos [85]. Un ejemplo extremo se ha observado en axones en regeneración pertenecientes a crustáceos, donde el axón es capaz de incluir estructuras como el núcleo de la célula adaxonal [86].

Conclusiones

La gran variedad de modelos y aproximaciones experimentales empleadas en distintas especies y diferentes neuronas indican que los procesos de transporte de RNA y la síntesis local de proteínas en los axones, probablemente estén ocurriendo en diferentes tipos neuronales y sus prolongaciones axónicas. Aunque los modelos *in vitro* han sido de gran utilidad, creemos necesario estudiar estos fenómenos en donde realmente ocurrirían. A modo de simplificación, la Figura 9, muestra nuestro modelo o hipótesis de trabajo. Allí todavía quedan varias preguntas para responder como: ¿existe síntesis local de proteínas en axones cortos? ¿Existen diferencias entre los mecanismos de regeneración *in vitro* e *in vivo*? ¿Cuáles son las diferencias entre los transcriptomas axonales normales y patológicos o entre los distintos tipos neuronales? ¿Qué tipo de funciones cumplen los mRNAs axonales? ¿Qué tipo de utilidad tiene el conocimiento a fondo

del transcriptoma neuronal para establecer estrategias terapéuticas en procesos de degeneración neuronal? Creemos que la respuesta integrada de glías y neuronas que incluya el componente de la síntesis local axonal de proteínas, es un campo de investigación actualmente muy activo que impactará en la comprensión de la biología celular axonal tanto en condiciones normales como patológicas.

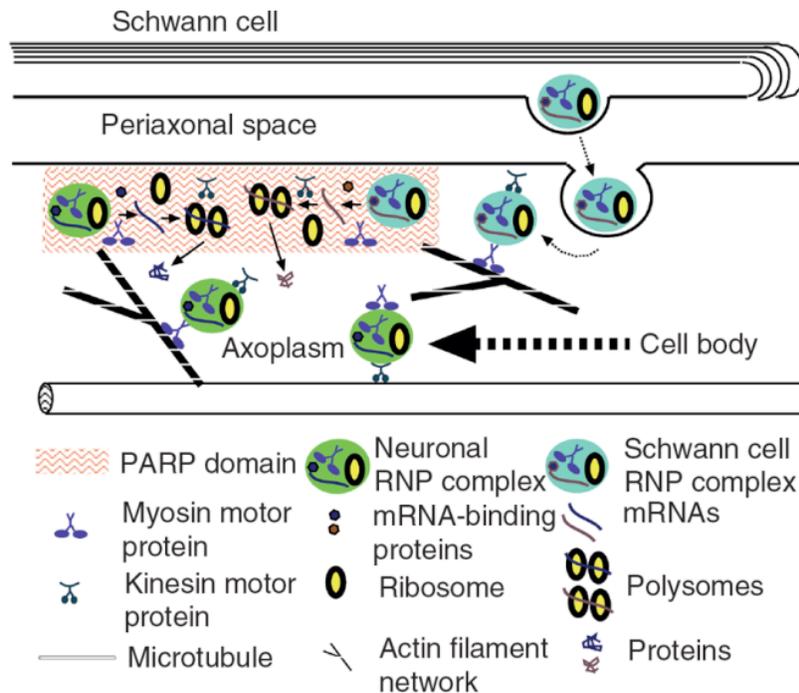


Figura 9. Síntesis local de proteínas en axones mielínicos. Se esquematiza una visión integrada de la localización de RNAm y su traducción local en territorios axonales. En un caso los RNAm se estarían transportando desde el soma neuronal (mecanismo operante quizás mayoritariamente en axones inmaduros), pero podría existir el transporte intercelular desde la glía circundante. Los puntos locales de traducción podrían ser las placas periaxoplásmicas u otros sitios citoplásmicos no corticales. Tomado de Sotelo-Silveira et al [6], cortesía de Wiley y Sons Ltd.

Referencias

1. Craig, A. M. y Banker, G. (1994) *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 267-310
2. Steward, O. y Ribak, C. E. (1986) *J. Neurosci.* **6**(10), 3079-3085
3. Palay, S. L. y Palade, G. E. (1955) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**(1), 69-88
4. Edstrom, J. E., Eichner, D. y Edstrom, A. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 178-184
5. Giuditta, A., Kaplan, B. B., van Minnen, J., Alvarez, J. y Koenig, E. (2002) *Trends Neurosci.* **25**(8), 400-404
6. Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Kun, A., Koenig, E. y Sotelo, J. R. (2006) *Traffic* **7**(5), 508-515
7. Alvarez, J., Giuditta, A. y Koenig, E. (2000) *Prog. Neurobiol.* **62**(1), 1-62
8. Twiss, J. L. y van Minnen, J. (2006) *J. Neurotraum.* **23**(3-4), 295-308
9. Tennyson, V. M. (1970) *J. Cell. Biol.* **44**(1), 62-79
10. Lyser, K. M. (1968) *Dev. Biol.* **17**(2), 117-142
11. Skoff, R. P. y Hamburger, V. (1974) *J. Comp. Neurol.* **153**(2), 107-147
12. Tennyson, V. M. (1965) *J Comp Neurol* **124**(3), 267-317

13. Caley, D. W. y Maxwell, D. S. (1968) *J. Comp. Neurol.* **133**(1), 45-70
14. Palay, S. L., Sotelo, C., Peters, A. y Orkand, P. M. (1968) *J. Cell. Biol.* **38**(1), 193-201
15. Zelena, J. (1970) *Brain Res.* **24**(2), 359-363
16. Zelena, J. (1972) *Folia Morphol. (Praha)* **20**(1), 91-93
17. Zelena, J. (1972) *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **124**(2), 217-229
18. Koenig, E. (1979) *Brain Res.* **174**(1), 95-107
19. Koenig, E. y Martin, R. (1996) *J. Neurosci.* **16**(4), 1400-1411
20. Koenig, E., Martin, R., Titmus, M. y Sotelo-Silveira, J. R. (2000) *J. Neurosci.* **20**(22), 8390-8400
21. Kun, A., Otero, L., Sotelo-Silveira, J. R. y Sotelo, J. R. (2007) *J. Neurosci. Res.* **85**(10), 2087-2098
22. Li, Y. C., Cheng, C. X., Li, Y. N., Shimada, O. y Atsumi, S. (2005) *J Anat* **206**(6), 535-542
23. Li, Y. C., Li, Y. N., Cheng, C. X., Sakamoto, H., Kawate, T., Shimada, O. y Atsumi, S. (2005) *Neurosci. Res.* **53**(3), 298-303
24. Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Cardenas, M., Koenig, E. y Sotelo, J. R. (2004) *J. Neurobiol.* **60**(2), 187-196
25. Sotelo-Silveira, J., Crispino, M., Puppo, A., Sotelo, J. R. y Koenig, E. (2008) *J. Neurochem.* **104**(2), 545-557
26. Sotelo, J. R., Benech, C. R. y Kun, A. (1992) *Neurosci. Lett.* **144**(1-2), 174-176
27. Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Kun, A., Benech, J. C., Sanguinetti, C., Chalar, C. y Sotelo, J. R. (2000) *J. Neurosci. Res.* **62**(1), 65-74
28. Bassell, G. J., Oleynikov, Y. y Singer, R. H. (1999) *Faseb J.* **13**(3), 447-454
29. Holt, C. E. y Bullock, S. L. (2009) *Science* **326**(5957), 1212-1216
30. Ross, A. F., Oleynikov, Y., Kislaukis, E. H., Taneja, K. L. y Singer, R. H. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**(4), 2158-2165
31. Kislaukis, E. H., Li, Z., Singer, R. H. y Taneja, K. L. (1993) *J. Cell Biol.* **123**(1), 165-172
32. Singer, R. H., y Ward, D. C. (1982) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(23), 7331-7335
33. Zhang, H. L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S. M., Liebelt, D. A., Dichtenberg, J. B., Singer, R. H. y Bassell, G. J. (2001) *Neuron* **31**(2), 261-275
34. Glinka, M., Herrmann, T., Funk, N., Havlicek, S., Rossoll, W., Winkler, C. y Sendtner, M. (2010) *Hum. Mol. Genet.* **19**(10), 1951-1966
35. Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J. y Singer, R. H. (2005) *Nature* **438**(7067), 512-515
36. Sasaki, Y., Welshhans, K., Wen, Z., Yao, J., Xu, M., Goshima, Y., Zheng, J. Q. y Bassell, G. J. (2010) *J. Neurosci.* **30**(28), 9349-9358
37. Todd, A. G., Morse, R., Shaw, D. J., McGinley, S., Stebbings, H. y Young, P. J. (2010) *J. Mol. Biol.* **401**(5), 681-689
38. Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A. K., Karle, K., Monani, U. R. y Sendtner, M. (2003) *J. Cell Biol.* **163**(4), 801-812
39. Pan, F., Huttelmaier, S., Singer, R. H. y Gu, W. (2007) *Mol. Cell Biol.* **27**(23), 8340-8351
40. Aronov, S., Aranda, G., Behar, L. y Ginzburg, I. (2001) *J. Neurosci.* **21**(17), 6577-6587
41. Aronov, S., Aranda, G., Behar, L., y Ginzburg, I. (2002) *J. Cell Sci.* **115**(Pt 19), 3817-3827
42. Andreassi, C., Zimmermann, C., Mitter, R., Fusco, S., De Vita, S., Saiardi, A. y Riccio, A. *Nat. Neurosci.* **13**(3), 291-301
43. Kiebler, M. A. y Bassell, G. J. (2006) *Neuron* **51**(6), 685-690
44. Sossin, W. S. y DesGroseillers, L. (2006) *Traffic* **7**(12), 1581-1589
45. Krichevsky, A. M. y Kosik, K. S. (2001) *Neuron* **32**(4), 683-696
46. Kim, S. y Coulombe, P. A. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**(1), 75-81
47. Ma, X. M., y Blenis, J. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**(5), 307-318
48. Gingras, A. C., Raught, B. y Sonenberg, N. (2004) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **279**, 169-197
49. Verma, P., Chierzi, S., Codd, A. M., Campbell, D. S., Meyer, R. L., Holt, C. E. y Fawcett, J. W. (2005) *J. Neurosci.* **25**(2), 331-342

50. Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P. D., Wang, C., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Kramvis, I., Sahin, M. y He, Z. (2008) *Science* **322**(5903), 963-966
51. Roberson, M. D., Toews, A. D., Goodrum, J. F. y Morell, P. (1992) *J. Neurosci. Res.* **33**(1), 156-162
52. Fabrizi, C., Kelly, B. M., Gillespie, C. S., Schlaepfer, W. W., Scherer, S. S. y Brophy, P. J. (1997) *J. Neurosci. Res.* **50**(2), 291-299
53. Giuditta, A., Chun, J. T., Eyman, M., Cefaliello, C., Bruno, A. P. y Crispino, M. (2008) *Physiol. Rev.* **88**(2), 515-555
54. Canclini L, K. A., Calliari A, Mercer J, Sotelo, J.R. y Sotelo-Silveira, J.R. (2011) *Curr. Chem. Biol.* **5**, 8
55. Willis, D. E., van Niekerk, E. A., Sasaki, Y., Mesngon, M., Merianda, T. T., Williams, G. G., Kendall, M., Smith, D. S., Bassell, G. J. y Twiss, J. L. (2007) *J. Cell Biol.* **178**(6), 965-980
56. Taylor, A. M., Berchtold, N. C., Perreau, V. M., Tu, C. H., Li Jeon, N. y Cotman, C. W. (2009) *J. Neurosci.* **29**(15), 4697-4707
57. Gumy, L. F., Yeo, G. S., Tung, Y. C., Zivraj, K. H., Willis, D., Coppola, G., Lam, B. Y., Twiss, J. L., Holt, C. E. y Fawcett, J. W. (2011) *RNA* **17**(1), 85-98
58. Zivraj, K. H., Tung, Y. C., Piper, M., Gumy, L., Fawcett, J. W., Yeo, G. S. y Holt, C. E. (2010) *J. Neurosci.* **30**(46), 15464-15478
59. Koenig, E. (1991) *Mol. Cell Neurosci.* **2**(5), 384-394
60. Eng, H., Lund, K. y Campenot, R. B. (1999) *J. Neurosci.* **19**(1), 1-9
61. Kaplan, B. B., Gioio, A. E., Hillefors, M. y Aschrafi, A. (2009) *Results Probl. Cell Differ.* **48**, 225-242
62. Hillefors, M., Gioio, A. E., Mameza, M. G. y Kaplan, B. B. (2007) *Cell Mol. Neurobiol.* **27**(6), 701-716
63. Aschrafi, A., Natera-Naranjo, O., Gioio, A. E. y Kaplan, B. B. *Mol. Cell Neurosci.* **43**(4), 422-430
64. Merianda, T. T., Lin, A. C., Lam, J. S., Vuppalanchi, D., Willis, D. E., Karin, N., Holt, C. E. y Twiss, J. L. (2009) *Mol. Cell Neurosci.* **40**(2), 128-142
65. Willis, D., Li, K. W., Zheng, J. Q., Chang, J. H., Smit, A., Kelly, T., Merianda, T. T., Sylvester, J., van Minnen, J. y Twiss, J. L. (2005) *J. Neurosci.* **25**(4), 778-791
66. Fabian, M. R., Sonenberg, N. y Filipowicz, W. (2010) *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 351-379
67. Hengst, U., Cox, L. J., Macosko, E. Z. y Jaffrey, S. R. (2006) *J. Neurosci.* **26**(21), 5727-5732
68. Natera-Naranjo, O., Aschrafi, A., Gioio, A. E. y Kaplan, B. B. (2010) *RNA* **16**(8), 1516-1529
69. Aschrafi, A., Schwechter, A. D., Mameza, M. G., Natera-Naranjo, O., Gioio, A. E. y Kaplan, B. B. (2008) *J. Neurosci.* **28**(47), 12581-12590
70. Hengst, U. y Jaffrey, S. R. (2007) *Seminars in cell & developmental biology* **18**(2), 209-215
71. Murashov, A. K., Chintalgattu, V., Islamov, R. R., Lever, T. E., Pak, E. S., Sierpinski, P. L., Katwa, L. C. y Van Scott, M. R. (2007) *Faseb J.* **21**(3), 656-670
72. Muslimov, I. A., Titmus, M., Koenig, E. y Tiedge, H. (2002) *J. Neurosci.* **22**(11), 4293-4301
73. Benech, C., Sotelo, J. R., Jr., Menendez, J. y Correa-Luna, R. (1982) *Exp. Neurol.* **76**(1), 72-82
74. Cutillo, V., Montagnese, P., Gremo, F., Casola, L. y Giuditta, A. (1983) *Neurochem. Res.* **8**(12), 1621-1634
75. Rapallino, M. V., Cupello, A. y Giuditta, A. (1988) *Neurochem. Res.* **13**(7), 625-631
76. Eyman, M., Cefaliello, C., Ferrara, E., De Stefano, R., Lavina, Z. S., Crispino, M., Squillace, A., van Minnen, J., Kaplan, B. B. y Giuditta, A. (2007) *Eur. J. Neurosci.* **25**(2), 341-350
77. Giuditta, A., Eyman, M. y Kaplan, B. B. (2002) *Biol. Bull.* **203**(2), 189-190
78. Lasek, R. J., Gainer, H. y Barker, J. L. (1977) *J. Cell Biol.* **74**(2), 501-523
79. Sotelo, J. R., Kun, A., Benech, J. C., Giuditta, A., Morillas, J. y Benech, C. R. (1999) *Neuroscience* **90**(2), 705-715
80. Court, F. A., Hendriks, W. T., MacGillavry, H. D., Alvarez, J. y van Minnen, J. (2008) *J. Neurosci.* **28**(43), 11024-11029
81. Simons, M. y Raposo, G. (2009) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **21**(4), 575-581
82. Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V. y Agnati, L. F. (2010) *J. Neural. Transm.* **117**(1), 1-4
83. Smalheiser, N. R. (2007) *Biol. Direct.* **2**, 35

84. Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P. y Gerdes, H. H. (2004) *Science* **303**(5660), 1007-1010
85. Kruger, L., Stolinski, C., Martin, B. G. y Gross, M. B. (1979) *J. Comp. Neurol.* **186**(4), 571-601
86. Pearce, J., Lnenicka, G. A. y Govind, C. K. (2003) *J. Comp. Neurol.* **464**(4), 449-462

Semblanza del Dr. José R. Sotelo Silveira



Nacido en 1972, realizó sus estudios de Licenciatura en Ciencias Biológicas en la Universidad de la Republica, y su Maestría (1998) y Doctorado (2003) en el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) de Uruguay. Durante ese periodo trabajó en la biología molecular del axón, en Montevideo y en el laboratorio de Edward Koenig en Buffalo, NY, pionero en estudios sobre los mecanismos de mantenimiento axonal. Después de graduarse, trabajó durante dos años como profesor asistente en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), investigando las consecuencias de la Esclerosis Lateral Amiotrófica en la biología molecular del axón motor. Posteriormente, obtuvo el premio PEW para científicos latinoamericanos jóvenes para realizar su posdoctorado en el National Cancer Institute del National Institute of Health. Allí realizó investigaciones en genómica funcional para estudiar los mecanismos de transporte y localización del RNA en las células neuronales. Durante ese periodo, realizó contribuciones relevantes en la biología molecular del cáncer, como el descubrimiento de nuevos “enhancers” del oncogén MYC, importantes en el desarrollo del cáncer de próstata y de colon. Después de su retorno a Uruguay en 2010, se instaló en el IIBCE y en la Facultad de Ciencias, trabajando en biología celular y molecular tanto a un nivel clásico como genómico, continuando su línea de trabajo en neuronas y desarrollando nuevas investigaciones en genómica.



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 131-142. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

DETERMINANTES MOLECULARES DE LAS NEUROTOXINAS DE ARÁCNIDOS IMPLICADOS EN LA UNIÓN A LOS CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

MOLECULAR DETERMINANTS OF ARACHNID NEUROTOXINS FOR BINDING VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNELS

Gerardo Corzo

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apartado Postal 510-3, CP 62210, Cuernavaca Morelos
corzo@ibt.unam.mx

Resumen

Los alacranes y las arañas están fenotípicamente relacionados y pertenecen a la clase arachnidae. Las glándulas del veneno de estos dos arácnidos han desarrollado neurotoxinas estructuralmente diversas aunque con función similar y con actividad biológica en receptores similares como son los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav). Si bien las neurotoxinas de araña y alacrán actúan sobre los Nav y se unen a receptores extracelulares similares, ambas neurotoxinas tienen estructuras primarias, secundarias y terciarias muy diferentes. Una principal característica de las neurotoxinas de arañas es que son más cortas que las neurotoxinas de alacrán y carecen de una estructura alfa-hélice, por lo cual el análisis molecular de las toxinas más cortas de araña podría ayudar a descifrar los residuos moleculares más importantes de las neurotoxinas del alacrán en canales de sodio dependientes de voltaje. Una exploración molecular mediante el reemplazo de aminoácidos por Alanina en dos toxinas de araña reveló la existencia de al menos dos superficies moleculares en las toxinas de arácnidos, una superficie necesaria para la unión al receptor y otra que ejecute la actividad biológica o funcional. Los residuos implicados en el reconocimiento al Nav son generalmente residuos básicos y aromáticos y el residuo que ejerce la actividad biológica es un aminoácido aniónico. Una aplicación potencial de estos resultados ha sido la generación de antígenos no-tóxicos contra la intoxicación causada por el piquete de alacrán.

Palabras clave: Arácnido, neurotoxina, péptido, canal de sodio, expresión heteróloga.

Abstract

Scorpions and spiders are phenotypically related and they belong to the class arachnidae. The venom glands of these two arachnids have evolved structurally different neurotoxins with similar function that recognize similar receptors. The most toxic spider and scorpion peptides target mainly the voltage-gated sodium channel (Nav) of insects and mammals, and they bind to similar extracellular receptors at the Nav but they share low sequence similarities as well as low secondary and three-dimensional structure correspondence. Spiders' toxins are shorter than that of scorpion toxins; therefore, the molecular analysis of the shorter spider toxins could help to decode the residues in a scorpion neurotoxin involve in binding to voltage-gated sodium channels. An alanine scan analysis of two spider toxins resulted for finding two molecular surfaces in the arachnid neurotoxins, which are each important for receptor binding or for biological activity. The residues of arachnid neurotoxins involved for Nav recognition are principally basic and aromatic residues, and the residue involved in biological activity seems to be just a single anionic residue. A potential application of these studies is the development of non-toxic scorpion antigens for generation of neutralizing antibodies against the envenomation caused for the sting of scorpions.

Keywords: Arachnid, neurotoxin, peptide, sodium channel, heterologous expression.

Introducción

Los arácnidos (Arachnida, del griego arákhnē, "araña" e -ides, "perteneciente a un grupo") son una clase de artrópodos quelicerados con patas articuladas y esqueleto externo rígido, el cual reemplazan periódicamente. El orden Arachnida incluye formas tan conocidas como las arañas, los alacranes y los ácaros. El cuerpo posee dos regiones o tagmas más o menos diferenciados, el prosoma (o cefalotórax) y el opistosoma (o abdomen). Los apéndices se insertan en el prosoma y son un par de quelíceros, junto a la boca, además de un par de pedipalpos, a veces muy desarrollados y cuatro pares de patas locomotoras. Carecen de antenas, y suelen tener uno o más pares de ojos simples, en lugar de grandes ojos compuestos como los insectos.

Existen aproximadamente unas 98,000 especies de arácnidos descritas, y son el segundo grupo más numeroso del reino animal, después de los insectos, y casi dobla en especies a los vertebrados. Los arácnidos se clasifican en 11 órdenes de especies vivientes, de los más abundantes en especies son las arañas, los ácaros, los opiliones, pero los más populares son las arañas, los ácaros y los alacranes.

La mayoría de los arácnidos son carnívoros, grandes predadores de otros artrópodos como insectos e inclusive de los mismos arácnidos, e ingieren su alimento en forma líquida o semilíquida una vez que los han predigerido mediante la inyección de jugos gástricos sobre la presa, a la cual han paralizado mediante el uso de la fuerza, o bien mediante la inyección de su veneno. No todos los arácnidos poseen glándulas venenosas, pero el veneno de las arañas y alacranes son de los más abundantes y conocidos, con efectos neurotóxicos, y de los cuales se conoce más sobre el tipo de componentes que éstos poseen.

Neurotoxinas de arácnidos

Como se ha mencionado, la mayoría de los arácnidos son carnívoros y grandes predadores, por lo cual las glándulas venenosas de alacranes y arañas se especializan en producir componentes que puedan paralizar a sus presas. El veneno de estos arácnidos es una mezcla tanto de moléculas orgánicas pequeñas como de proteínas de bajo y alto peso molecular. Las proteínas de bajo peso molecular denominadas péptidos juegan un papel importante ya que la mayoría de ellas son neurotóxicas, los cuales son generalmente, moléculas reticuladas con tres o cuatro puentes disulfuro; además presentan un cantidad mayor de residuos básicos que residuos ácidos, por lo que el punto isoeléctrico de estas moléculas es mayor a 7. Dentro del grupo de péptidos neurotóxicos, en el veneno de los alacranes, existen dos tipos de péptidos de acuerdo al contenido de aminoácidos presente en su estructura primaria: aquellos de 30 a 40 residuos, y aquellos con un contenido de 60 a 70 residuos de aminoácidos. El primer grupo, afecta generalmente a canales iónicos de potasio dependientes de voltaje (Kv) y el segundo, a canales iónicos de sodio dependientes de voltaje (Nav). En el caso de los venenos de arañas, esta división por tamaño no es tan clara como en el caso del veneno de los alacranes. En el veneno de las arañas, las neurotoxinas tienen una estructura primaria de 25 a 45 aminoácidos pero algunas de ellas pueden afectar tanto a Kv como a Nav, independientemente de su tamaño.

Canales iónicos como blanco principal de las neurotoxinas de arácnidos

Las células cuentan con dos tipos principales de proteínas que permiten el paso de moléculas a través de la membrana: proteínas que permiten transportar moléculas orgánicas específicas a través de ellas y proteínas de membrana que forman un estrecho poro hidrofílico que fluctúa entre estados abiertos y cerrados y por donde se desplazan iones de forma selectiva llamados canales iónicos. En general, todos los canales iónicos están definidos por dos características principales: selectividad iónica y mecanismo de apertura y cierre [1]. Los canales iónicos permiten que algunos iones puedan pasar y otros no, lo cual implica que deben tener una estructura, una geometría interna y un ambiente químico que da selectividad al paso del ión a través de ellos. Dependiendo del tipo de ión que pasa por el poro del canal, los canales iónicos pueden ser de potasio, de sodio, de calcio, etc. En la mayoría de los casos, en los canales iónicos el estado abierto se da en respuesta a un estímulo específico, como son los cambios en el voltaje de la membrana, estímulos mecánicos, estímulos químicos y la unión de ligandos a sus receptores. El ligando puede ser extracelular o intracelular. Los canales iónicos son responsables de la excitabilidad eléctrica del sistema nervioso y de los músculos y una célula nerviosa puede contener varios tipos de canales iónicos en su membrana [1-4].

Dado que las neurotoxinas de arácnidos afectan principalmente a canales iónicos y entorpecen la comunicación celular, éstas tienen un blanco de acción muy amplio y actúan en canales iónicos de diferentes especies como en insectos o en mamíferos. La principal causa por la que el veneno de algunas especies de arácnidos son peligrosos para el humano se debe a que algunos receptores en insectos mantienen una alta identidad similar al de mamíferos, lo cual puede ser considerado una coincidencia evolutiva, ya que de ninguna manera se pensaría que un humano sería la presa de una araña, un alacrán, o un ácaro. De igual manera esta coincidencia evolutiva atrae el interés médico y científico de conocer la estructura de las neurotoxinas y sus componentes moleculares que afectan tanto a insectos como a humanos.

A continuación brevemente se explicarán los intentos por conocer el modo en que las neurotoxinas de arácnidos se unen a los canales de sodio dependientes de voltaje y sus implicaciones biológicas.

Canales de sodio dependiente de voltaje

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) son responsables de la entrada rápida de iones sodio a la célula que provoca un potencial de acción en nervios, músculos y células endocrinas, lo que es esencial para la generación y propagación de impulsos nerviosos [5, 6]. Los canales de sodio se conforman por una subunidad α de 220-260 kDa que contienen elementos de sensor de voltaje y formadores de poro en un solo complejo de proteína y una o dos subunidades auxiliares β de aproximadamente 33-36 kDa. Las subunidades α están compuestas por cuatro dominios homólogos que contienen cada uno seis segmentos hidrofóbicos transmembranales. Un asa, que atraviesa la membrana, entre los segmentos S5 y S6, de cada dominio, constituye el vestíbulo del poro del canal [7]. El canal responde a voltaje debido a sus segmentos S4, los cuales contienen motivos repetidos de un residuo de aminoácido positivamente cargado (lisina o arginina) cada tercera posición, siendo éstos los que por señales eléctricas inician un cambio conformacional que abre el poro, lo que produce la despolarización de la membrana necesaria para generar los potenciales de acción [3, 7, 8]. En los humanos, nueve subunidades α de canales de sodio dependientes de voltaje se han caracterizado: $Na_v1.1$ – $Na_v1.9$. Las subunidades auxiliares del canal de sodio, $Na_v\beta1$ – $Na_v\beta4$, interactúan con las diferentes subunidades α y alteran sus propiedades fisiológicas y su localización subcelular [3].

Los canales de sodio son los únicos que representan blancos moleculares para varios grupos de neurotoxinas, que alteran fuertemente el funcionamiento del canal, por unión a diferentes sitios en el receptor [3]. Debido a su gran afinidad y especificidad, las neurotoxinas representan herramientas poderosas para estudiar la estructura y función de los canales de sodio, afectando tanto la permeabilidad como las propiedades de apertura del canal. Hasta ahora, seis diferentes sitios de unión a neurotoxinas se han identificado en el canal de sodio dependiente de voltaje, los cuales se esquematizan en la figura 1 [3, 7, 9, 10].

Con respecto a los sitios blanco de neurotoxinas de arácnidos, éstas actúan sobre la superficie molecular del canal de sodio y pueden unirse a los denominados sitios 3 y 4 (Figura 1). Es importante notar que la unión de las neurotoxinas de arácnidos a estos sitios provocan una apertura y cierre del canal diferente generando corrientes iónicas características, por lo cual la respuesta del Nav a las neurotoxinas de arácnidos que se unen a los sitios 3 y 4 tienen una farmacología muy particular; por ejemplo, las neurotoxinas que se unen al sitio 3 generan un bloqueo de la inactivación de los Nav. Por otro lado, las neurotoxinas que se unen al sitio 4 activan a los Nav a voltajes de membrana más negativos que los normales.

Neurotoxinas de arácnidos que afectan a los Nav de insectos y mamíferos

Como se ha mencionado, el interés científico en las neurotoxinas de arácnidos ha llevado a entender el mecanismo por el cual estas moléculas se unen a los Nav. Como primer ejemplo comparamos las neurotoxinas que son específicas para insectos y que no reconocen ni afectan los Nav de mamíferos. Las toxinas Bj-xrtIT, LqhIT2 y PaluIT2 provenientes de los venenos de los alacranes *Buthotus judaicus* y *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, y de la araña *Paracoelotes luctuosus*, respectivamente, se unen al mismo sitio 4 en los Nav de insectos. El término IT se refiere a "insecto-toxinas", las cuales han sido utilizadas para conocer los residuos moleculares que son determinantes en la afinidad hacia el sitio 4 de los Nav. Es importante notar que la estructura primaria en dichas neurotoxinas es diferente y presenta porcentajes de identidad muy bajos de 39 y 16 % entre ellas (Tabla 1). Similarmente, la estructura tridimensional de las toxinas de alacrán y de araña son completamente diferentes. Sin embargo, es importante resaltar que reconocen al mismo sitio 4 de los Nav de insectos. Para conocer la función molecular de los aminoácidos que componen a la neurotoxina PaluIT2, ésta fue analizada mediante el reemplazamiento de la mayoría de sus aminoácidos por alanina, excepto glicina, prolina y cisteína ya que estos residuos son mayormente indispensables para la estructura y no para la función de una proteína. En este tipo de análisis se reemplazó cada aminoácido por la

alanina, ya que este aminoácido es el más simple que mantiene su centro asimétrico, a diferencia de la glicina, y por tanto conserva sin alteración, el esqueleto peptídico de la proteína. Además es importante resaltar que las neurotoxinas de araña son mas cortas que las neurotoxinas de alacrán y por tanto, un análisis de reemplazo molecular requerirá menos esfuerzo en una toxina araña que en una de alacrán (Tabla 1).

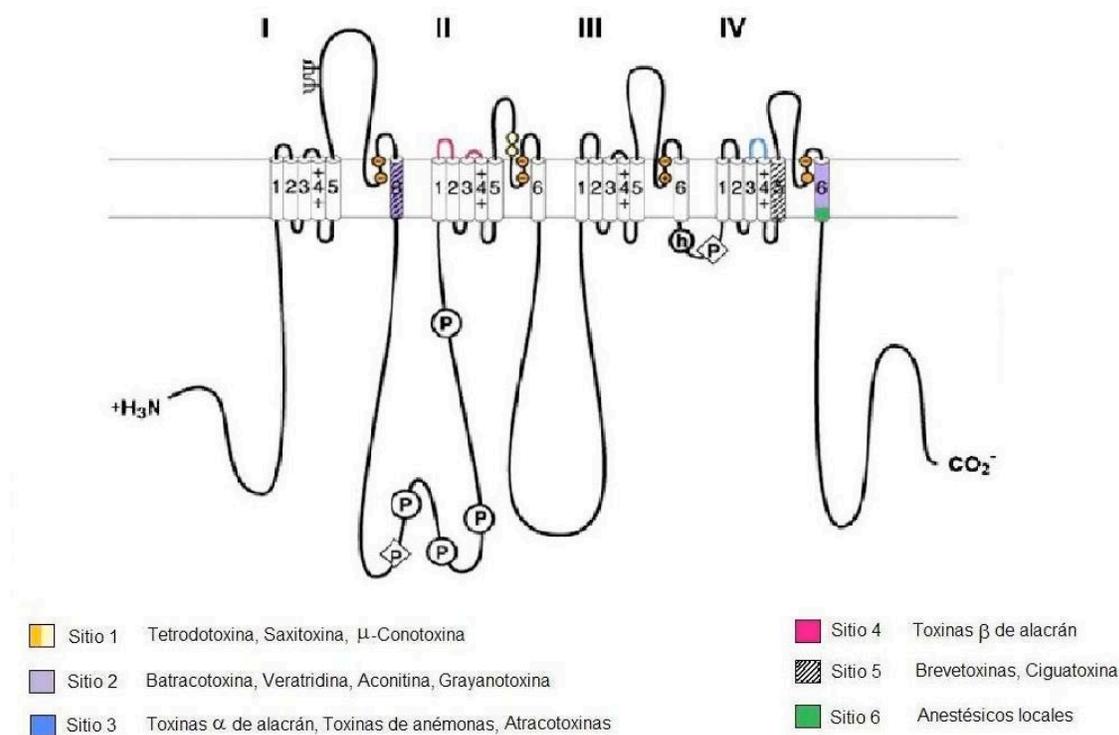


Figura 1. Sitios de unión de neurotoxinas en los NaCh [3].

Tabla 1. Identidad de la secuencia primaria entre neurotoxinas de alacrán y araña

Toxina	Origen	Secuencia primaria	AA, Cys	Identidad (%)	Accs
Insecto específicas					
BjxtrIT	Alacrán	KKNGYPLDRNGKTT ESGVNAIAPHYCNSECTKVYYA ESGYCCWGAICYCFGLEDDKPIGPMKDITKKYCDVQIIPS	76,8	100	P56637
LqhlT2	Alacrán	DGYIKRRD GCKVA CLIGNEG CDKECKAYGGSYGYCWTW GLACWCEGLPDDKTWKSETNTCG	61,8	39	Q26292
PalulT2	Araña	ACVGDGQR CASWSGPY CCDGY CSRSMPY CRCRNNS	37,8	16	P83257
Tóxicas a mamíferos					
CsslV	Alacrán	KEGYLVNSYTG CKFECFKLGDNDYCLRECRQQYGKGGG YCYAFGCWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN	66,8	100	P60266
Magi5	Araña	GCKLTFWKCKNKKECCGWNA CALGICMPR	28,6	17	P83561

AA significa cantidad de aminoácidos. Cys significa contenido de cisteínas.
Accs significa número de acceso en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org>).

Para este trabajo se sintetizaron químicamente 25 variantes de la neurotoxina PaluIT2. La estructura secundaria de todas las variantes de la neurotoxina PaluIT2 modificadas por alanina, o por otro aminoácido, se corroboró mediante dicroísmo circular (Figura 2A). Solamente la variante S27A mostró una estructura secundaria diferente a la nativa, por lo cual esta variante no fue considerada para los ensayos biológicos. Únicamente las variantes correctamente estructuradas y plegadas fueron utilizadas para los ensayos biológicos de unión a Nav utilizando sinaptosomas de insectos (Figura 2B), y posteriormente se realizaron ensayos de toxicidad con estas misma variantes.

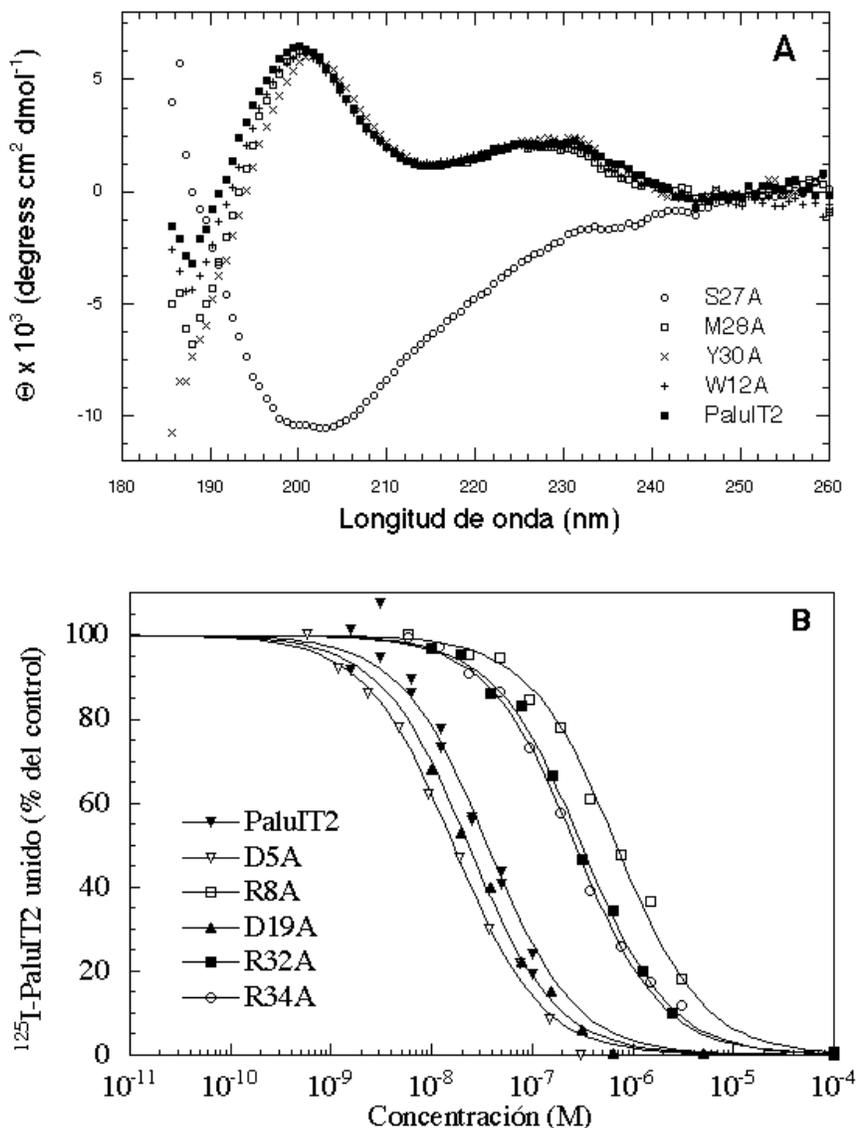


Figura 2. Dicroísmo circular y ensayos de unión a Nav de insectos. A) muestra el dicroísmo circular de cuatro variantes de PaluIT2, una de ellas S27A, tiene una estructura secundaria diferente a la nativa. B) muestra los ensayos de unión de cinco variantes de PaluIT2 en donde las variantes D5A y D19A son mas afines a los Nav de insectos.

De este modo, se correlacionó tanto la unión al receptor en condiciones *in vitro* como el efecto tóxico *in vivo* (Tabla 2). El análisis de todas las variantes de alanina en la neurotoxina PaluIT2 permitió entender que existen al menos dos superficies moleculares en las toxinas de araña, las cuales son responsables tanto del reconocimiento al sitio de unión como a la actividad biológica en el Nav.

Tabla 2. Actividades biológicas de unión y de toxicidad de la neurotoxina PaluIT2 y sus variantes

Toxina	Ki ^a (nM)	n	Ki/Ki nativa	LD ₅₀ ^b ng/mg insecto	n	LD ₅₀ /LD ₅₀ nativa
Nativa	12.7 ± 3.2	6	1	25.2 ± 5.2	2	1
V3A	14.1 ± 2.7	2	1.1	23.8 ± 3.9	2	0.9
D5A	9.6 ± 3.2	4	0.76	22.9 ± 4.1	2	0.9
Q7A	18.8 ± 0.3	2	1.5	24.5 ± 2.3	2	1
R8A	642 ± 19	2	51	33.2 ± 5.4	2	1.3
R8D	>1000	2	>80	126.4 ± 9.4	2	5.0
S11A	23.5 ± 3.9	2	1.8	26.4 ± 4.2	2	1
W12A	>2000	2	>160	>200	2	>8
W12F	171 ± 9	2	13.5	31.0 ± 4.7	2	1.2
S13A	8.3 ± 2.8	3	0.65	28.6 ± 3.7	2	1.1
Y16A	12.5 ± 1.2	2	1.0	33.1 ± 5.8	2	1.3
D19A	11.1 ± 2.2	3	0.87	75.4 ± 7.3	2	2.9
Y21A	53.1 ± 7.2	2	4.2	36.3 ± 4.9	2	1.4
Y22A	682 ± 68	2	54	52.8 ± 6.1	2	2.1
S24A	504 ± 161	3	40	44.6 ± 3.6	2	1.8
R26A	206 ± 66.7	2	16	43.3 ± 6.0	2	1.7
S27A	5703 ± 762	2	450	>200	2	>8
M28A	175 ± 46	2	14	40.5 ± 4.8	2	1.6
Y30A	742 ± 107	2	58	128.2 ± 8.6	2	5.1
Y30F	202 ± 22	2	16	34.7 ± 4.3	2	1.4
R32A	307 ± 15	2	24	58.5 ± 3.8	2	2.3
R34A	228 ± 8	2	18	42.7 ± 4.2	2	1.7
N35A	24.1 ± 2.1	2	1.9	31.3 ± 2.6	2	1.2
N36A	25.5 ± 6.2	3	2.0	29.6 ± 2.7	2	1.2
S37A	12.3 ± 0.9	2	1.0	27.5 ± 4.2	2	1.1

a: Ki fue determinado mediante ensayos de unión a sinaptosomas de cucaracha.

b: LD₅₀ fue determinado después de 24 horas posteriores a las inyecciones a insectos y representa el 50% de mortalidad de 6 dosis/grupo utilizadas con 5 insectos en cada grupo.

En la Figura 3 se muestra una correlación entre las actividades normalizadas de los ensayos de unión y los ensayos insecticidas *in vivo*. Los aminoácidos responsables de la unión son aquellos básicos como las argininas y lisinas, y los aromáticos como las tirosinas y triptófanos. Estos datos concuerdan con aquellos reportados por Bogan and Thorn [11] donde en una base de datos de más de 30 interacciones de las interfases proteína-proteína se encuentran a los residuos Trp, Tyr, Lys y Arg como los más propensos a estar involucrados en este tipo de

interacción. Por otro lado, los residuos aniónicos están involucrados en la actividad biológica, ya que el reemplazamiento de residuos aniónicos por alanina resultó en una baja actividad biológica, sin embargo, mantuvieron una fuerte unión al sitio 4 del Nav.

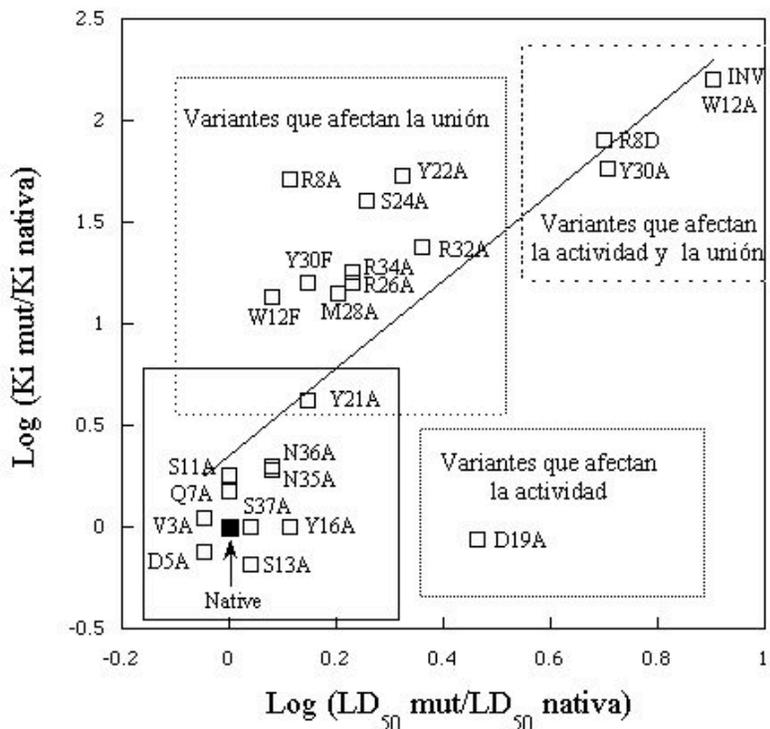


Figura 3. Correlación entre el logaritmo de la unión a receptor y el logaritmo de la toxicidad.

Con el fin de conocer si los mismos residuos moleculares en la toxina de araña PaluT2 están implicados en el mismo tipo de reconocimiento que de las neurotoxinas de alacrán Bj-xrtIT y LqhIT2 hacia los Nav, la estructura tridimensional de las tres neurotoxinas “insecto-específicas” fueron superimpuestas para observar residuos comunes (Figura 4). En esta figura se observa cómo varios residuos de cada una de estas neurotoxinas mantienen un denominador común, el cual es un anillo de residuos básicos (Figura 4, color azul) con residuos de tirosina en el centro (Figura 4, color rojo). Los resultados que se muestran en la figura 4 sugieren que los residuos comunes en las neurotoxinas “insecto-específicas” tienden a ser los residuos básicos y tirosinas en su unión al sitio 4 de los Nav de insectos.

Este ejemplo de convergencia de estructuras diferentes hacia un sitio específico en los Nav de insectos fue confirmado con neurotoxinas de arácnidos que afectan Nav de mamíferos. Las neurotoxinas Magi 5 y CsslV provenientes del veneno de la araña *Macrothele gigas* y del veneno del alacrán *Centruroides suffusus suffusus*, respectivamente, reconocen al mismo sitio 4 en el canal Nav. En este caso, la identidad entre ellas es también muy bajo, de tan solo 17% (Tabla 1). Similarmente al caso de PaluT2, la neurotoxina de araña Magi 5 fue analizada mediante sustituciones de alaninas. Las estructuras secundarias fueron comparadas, con respecto a la estructura nativa, y todas aquellas toxinas plegadas fueron ensayadas en canales

de sodio dependientes de voltaje Nav1.2. Al igual que en los resultados anteriores, los residuos básicos e hidrofóbicos resultaron importantes para la actividad biológica. Además, el único residuo aniónico E15A fue importante en dicha actividad biológica, confirmando que existen superficies moleculares responsables de la unión o reconocimiento al receptor y superficies moleculares estrictamente importantes para ejercer una función biológica.

Una comparación estructural de la toxina de araña Magi 5 con la toxina de alacrán sugirió que los aminoácidos aniónicos en posición E15 y E28 son importantes en la actividad biológica de las neurotoxinas de alacrán. Los residuos aniónicos en las neurotoxinas de arácnidos estarían involucrados en lo que se denomina inmovilización del sensor de voltaje de los Nav. Como fue mencionado en la sección **canales de sodio dependiente de voltaje**, los segmentos S4 contienen motivos repetidos de un residuo de aminoácido positivamente cargado (lisina o arginina) cada tercera posición, siendo éstos los que por señales eléctricas inician un cambio conformacional que es inmovilizado durante el movimiento de apertura por ciertos residuos aniónicos de las neurotoxinas [12]. Por lo anterior, es que en México la picadura del veneno de alacrán es de gran importancia médica, se necesitan de antígenos para generar anticuerpos contra la picadura de estos arácnidos, y de este modo, la creación de neurotoxinas antigénicas no tóxicas podrían ser una alternativa para generar anticuerpos neutralizantes con la ventaja de mejorar su calidad y mejorar el sistema de inmunización de animales mayores sin comprometer la salud de estos.

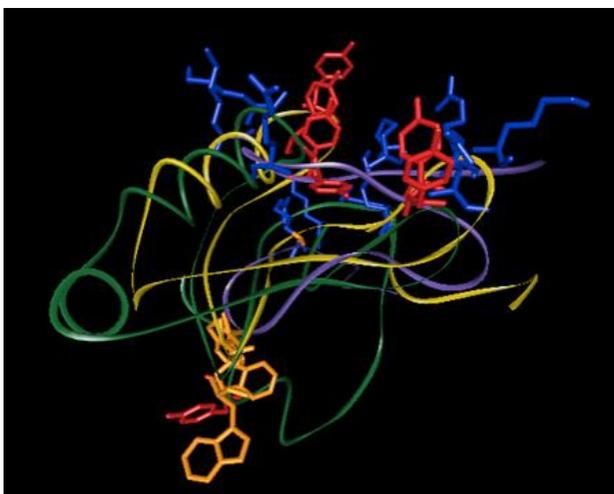


Figura 4. Superimposición de estructuras de araña y alacrán. Neurotoxina LqhIT2 (amarillo), Bj-xrtIT (verde) y PaluIT2 (morado). En azul se resaltan los aminoácidos positivos (Lisina y Arginina) y en rojo (tirosinas) y en naranja (triptofano) los aminoácidos aromáticos.

Conclusiones

Los resultados muestran que las neurotoxinas de arácnidos que afectan los Nav exponen al menos dos superficies moleculares, donde al menos una es responsable del reconocimiento de su receptor en el Nav (responsable de la mayor afinidad por el Nav, pero sin efecto biológico), y la otra afecta la función del Nav (poca afinidad pero con efecto biológico significativo) [13, 14]. Se ha demostrado que las neurotoxinas que se unen al sitio 4 de los Nav, que provienen de alacranes o de arañas, contienen aminoácidos aniónicos, capaces de inmovilizar a los sensores de voltaje de estos Nav [12-15]. Este mecanismo molecular elucidado

es de gran importancia para generar neurotoxinas no tóxicas que puedan suplir a los antígenos comerciales promoviendo el mantenimiento de animales ponzoñosos en sus nichos, los cuales son importantes en sus ecosistemas para mantener la homeostasis de estos. Un ejemplo concreto es el caso del antiveneno contra la mordedura de la araña violinista, donde la neurotoxina esfingomielinasa-D (la más tóxica del veneno de las arañas del género *Loxoceles*) es producida mediante la técnica del ADN-recombinante y usada para inmunizar animales modelo para generar anticuerpos neutralizantes (antiveneno) contra la mordedura de estas arañas [16]. El uso de proteínas recombinantes para la generación de antivenenos es una realidad en nuestro país y que podría extrapolarse a otros ejemplos de animales ponzoñosos como alacranes y serpientes, aunque en el caso de las serpientes las neurotoxinas involucradas afectan otros receptores iónicos. Una limitante para utilizar neurotoxinas recombinantes como inmunógenos es que dichas neurotoxinas estén propiamente plegadas, al igual que la proteína parental, con el objetivo de que las neurotoxinas sintéticas puedan presentar epítopes que generen anticuerpos neutralizantes de alta afinidad.

Con respecto al potencial de las neurotoxinas específicas contra insectos, las neurotoxinas de arácnidos han sido propuestas como candidatos para el desarrollo de nuevos pesticidas biológicos, debido a su mecanismo de acción que evita el daño a especies de otros géneros o familias [17-19]. Debido a que en los últimos años se ha generado un incremento significativo en el número de plagas con resistencia a pesticidas, existe una necesidad de desarrollar insecticidas novedosos que ayuden a solucionar esta problemática. Una limitante para el caso de neurotoxinas como bioinsecticidas es el desarrollar un método de aplicación correcto ya que éstas deben cruzar una barrera epitelial para ejercer su acción. Las aplicaciones más directas que se han sugerido es a través de un vehículo que pase por estas barreras epiteliales, como los baculovirus. La neurotoxina en cuestión se fusiona a una proteína viral y al ser expresada en el insecto, dicha neurotoxina repercute en tiempos menores de aniquilamiento del insecto plaga [20-22]. Sin embargo, las neurotoxinas específicas contra insectos pueden ser útiles para revelar nuevos receptores en insectos para ser blanco de nuevos biopesticidas.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) proyecto número IN220809 a Gerardo Corzo.

Referencias

1. Catterall W. A. (1992) *Physiol. Rev.* **72**, S15-48
2. Waxman, S. G., Cummins, T. R., Black, J. A., y Dib-Hajj, S. (2002) *Novartis Found. Symp.* **241**, 34-51; discussion 51-60
3. Wood, J. N., Boorman, J. P., Okuse, K., y Baker, M. D. (2004), *J. Neurobiol.* **61**, 55-71
4. Caldwell, J. H., Schaller, K. L., Lasher, R. S., Peles, E., y Levinson, S. R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5616-5620
5. Bosmans, F., Martin-Eauclaire, M. F., y Swartz, K. J. (2008) *Natura* **13**, 202-208
6. Catterall, W. A., Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., y Scheuer, T. (2007) *Toxicon* **49**, 124-141
7. Yu, F. H., y Catterall, W. A. (2003) *Genome Biol.* **4**, 207
8. Clare, J. J., Tate, S. N., Nobbs, M., y Romanos, M. A. (2000) *Drug Discov. Today* **5**, 506-520
9. Pallaghy, P. K., Nielsen, K. J., Craik, D. J., y Norton, R. S. (1994) *Protein Sci.* **3**, 1833-1839
10. Krzemien, D. M., Schaller, K. L., Levinson, S. R., y Caldwell, J. H. (2000) *J. Comparative Neurology* **420**, 70-83
11. Bogan, A. A. y Thorn, K. S. (1998) *J. Mol. Biol.* **280**, 1-9
12. Cestele, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., y Catterall, W. A. (1998) *Neuron*. **21**, 919-931

13. Corzo, G., Sabo, J. K., Bosmans, F., Billen, B., Villegas, E., Tytgat, J., y Norton, R. S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 4643-4652
14. Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Ilan, N., Benveniste, M., Gordon, D., y Gurevitz, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 5045-5053
15. Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Froy, O., Corzo, G., Angelovici, R., Gordon, D., y Gurevitz, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 8206-8211
16. Olvera, A., Ramos-Cerrillo, B., Estevez, J., Clement, H., de Roodt, A., Paniagua-Solis, J., Vazquez, H., Zavaleta, A., Arruz, M. S., Stock, R. P., y Alagon, A. (2006) *Toxicon* **48**, 64-74
17. Bonning, B. C., y Hammock, B. D. (1996) *Annu. Rev. Entomol.* **41**, 191-210
18. Tomalski, M. D., y Miller, L. K. (1992) *Bio/Technology* **10**, 545-549
19. Stewart, L. M. D., Hirst, M., Lopez-Ferber, M., Merryweather, A. T., Cayley, P. J., y Possee, R. D. (1991) *Nature* **352**, 85-88
20. Chejanovsky, N., Zilberberg, N., Rivkin, H., Zlotkin, E., y Gurevitz, M. (1995) *FEBS Lett.* **376**, 181-184
21. Hoover, K., Schultz, C. M., Lane, S. S., Bonning, B. C., Duffey, S. S., McCutchen, B. F., y Hammock, B. D. (1995) *Biological Control* **5**, 419-426
22. Hughes, P. R., Wood, H. A., Breen, J. P., Simpson, S. F., Duggan, A. J., y Dybas, J. A. (1997) *J. Invertebr. Pathol.* **69**, 112-118

Semblanza del Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete



Nació en el estado de Chiapas donde realizó la mayor parte de sus estudios antes de recibirse como Ingeniero en Bioquímica Industrial en la Universidad Autónoma Metropolitana plantel Iztapalapa (UAM-I) en 1986. Posteriormente trabajó en aspectos relacionados a la química en compañías nacionales como Dispersiones de México, S.A. e Ingenieros Civiles Asociados (ICA). En el periodo de 1989 a 1993 realizó 1) sus estudios de maestría en Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en co-tutoría con la UAM-I, 2) una estancia en los Laboratorios para la Industria del Japón, en la ciudad de Tsukuba bajo el patrocinio de la Agencia de Cooperación Japonesa (JICA), y 3) fue profesor asociado de tiempo parcial en la misma UAM-I. En el periodo de 1993 a 1997, realizó sus estudios de doctorado sobre Microbiología de Bacterias Lácticas en la Universidad Estatal de Oklahoma (OSU). En el periodo de 1997 a 2000, el Dr. Corzo realizó una estancia como posdoctorante en Instituto Suntory de Investigaciones Bioorgánicas (SUNBOR) en Osaka en Japón, en el cual al final de dicho periodo fue contratado como investigador en el mismo Instituto hasta el año 2004. El Dr. Corzo realizó también una estancia académica en el año 2002 en el Departamento de Ingeniería de estudios de proteínas (DIEP) perteneciente a la Comisaria de Energía Atómica (CEA), en Saclay, Francia. La investigación realizada en los siete años de estancia en Japón y Francia fue relacionada a la Química de Péptidos provenientes del veneno de arácnidos. En abril del 2004 regresó a México en donde actualmente se encuentra contratado como Investigador Titular B definitivo por la UNAM y adscrito al Instituto de Biotecnología, Campus Morelos. En el Instituto de Biotecnología-UNAM su investigación se ha enfocado en 1) el desarrollo de un sistema de expresión de péptidos ricos en puentes disulfuro, 2) el estudio de la relación estructura-función de péptidos de arácnidos con sus receptores celulares, y 3) el estudio de péptidos microbicidas como potenciales antibióticos contra bacterias patógenas. El Dr. Corzo ha publicado más de 60 artículos internacionales arbitrados e indexados el Science Citation Index (SCI), 5 patentes (internacionales y nacionales) y ha graduado estudiantes de doctorado (1) y maestría (3).



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 143-156. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES IN SILICO, A PARTIR DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE UNA PROTEÍNA ¿CÓMO SABER QUE EL MODELO ES REALISTA?

TRIDIMENSIONAL STRUCTURES PREDICTED IN SILICO FROM THE AMINO ACID SEQUENCE OF PROTEINS. HOW TO KNOW THAT THE MODEL IS REALISTIC?

Rogelio Rodríguez-Sotres, Samantha A. Gaytán-Mondragón, Eric E. Hernández-Domínguez y Lilian G. Valencia Turcotte
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
Cd. Univeristaria, Coyoacán, CP 04510, México DF
sotres@servidor.unam.mx

Resumen

La mayoría de las proteínas se forman con sólo 20 aminoácidos, pero sus posibles combinaciones conducen a números inmanejables de secuencias y de probables conformaciones. Por tanto, la predicción de la estructura tridimensional real, a partir de la información de la secuencia de aminoácidos es un problema aún sin solución. Sin embargo, existen estrategias de cómputo que se aproximan al problema y la de mayor éxito es el modelado por homología. Varios servidores de Internet ofrecen herramientas para modelar proteínas, pero un problema importante es determinar si el modelo obtenido responde a la realidad biológica. Casi todos los métodos de calificación de la calidad de los modelos analizan la congruencia geométrica y fisicoquímica de la estructura tridimensional predicha. El método reciente, llamado Rd.HMM, informa sobre la probabilidad de que el modelo propuesto pueda alojar, en la realidad biológica, a la secuencia que se deseaba modelar, al tiempo que recupera otras secuencias naturales que adoptan un plegamiento semejante. Finalmente, se muestra como se puede aplicar Rd.HMM para mejorar las posibilidades de éxito en el modelado por homología.

Palabras clave: Estructura tridimensional de proteínas, Modelado in silico, bioinformática, calificación de un modelo.

Abstract

Most proteins are formed only with 20 amino acids. Yet, combinatorial possibilities lead to intractably large numbers of sequences and theoretical conformations. Thus, the prediction of the true three-dimensional structure from protein sequence information alone is not currently possible. Nevertheless, amongst the approximate solutions to this problem, homology modeling is the one with highest success rate. Many international Internet servers can produce theoretical 3D-models of proteins, but they offer no guarantee in regard to the biological appropriateness of the proposed 3D structure. Current methods to score the quality of a three-dimensional protein structural model are based mostly on geometrical and physicochemical considerations. However, a recent method called Rd.HMM gives information on whether the model is likely to host the amino acid sequence of interest in real biology. In addition, it finds if other related natural sequences can be modeled with a similar framework. This works describes how Rd.HMM can improve homology modeling success rate.

Keywords: Tridimensional structure of proteins, in silico modeling, bioinformatics, model scoring.

El problema de la predicción de la estructura 3D de las proteínas, a partir de su secuencia de aminoácidos

Desde el punto de vista químico, las proteínas son heteropolímeros, porque provienen de la polimerización de varios monómeros distintos. En la naturaleza, tal diversidad está relativamente restringida, ya que el código genético sólo codifica para 20 diferentes aminoácidos (aunque algunas proteínas se sintetizan y sufren cambios no codificados en el gen correspondiente). Aún así, las funciones que las proteínas realizan en las células son muy numerosas y una muestra de esta multitud de funciones está en las bases de datos sobre estructura y función de proteínas. Por ejemplo, la base de datos "Gene Ontology" (1) reconocía 17069 procesos biológicos, 8637 funciones moleculares y 2432 componentes celulares (hasta enero del 2010; Ref. 2).

Las funciones de una proteína están íntimamente asociadas a la forma en que la cadena de aminoácidos se pliega en el espacio tridimensional. Así, para comprender las funciones de una proteína es necesario conocer su secuencia de aminoácidos y su estructura 3D, o plegamiento. El plegamiento de una proteína está determinado por la conformación espacial que adopta cada uno de los restos de aminoácidos que la componen. Entonces: ¿Cómo podemos explicar tal diversidad de funciones con 20 aminoácidos? - la respuesta está en la combinatoria: Si unimos dos aminoácidos eligiendo cualesquiera de los 20 en ambas posiciones, tendremos 400 diferentes combinaciones posibles. Una proteína natural de tamaño promedio tiene unos 300 aminoácidos, podríamos tener 20^{300} proteínas con secuencia distinta, que equivale a 1×10^{390} . Para poner en contexto la magnitud de este número, baste decir que la masa del universo equivale a 6×10^{75} electrones y que la edad del universo es de tan sólo 4×10^{17} segundos. Si cada segundo, cada electrón en el universo representara una secuencia distinta de aminoácidos, tan sólo se representarían 2×10^{93} posibles secuencias. En otras palabras, a lo largo de toda la evolución, es seguro que la naturaleza no ha ensayado todas las posibles secuencias de aminoácidos.

En una proteína, cada residuo de aminoácido puede adoptar diferentes conformaciones posibles, según sus propiedades y la influencia de sus vecinos. Aquí aparece otro problema de

combinatoria clásico conocido como la paradoja de Levinthal (3). Si cada aminoácido de una proteína de 100 residuos puede adoptar 3 conformaciones, el número de conformaciones posibles sería 3^{100} , que equivale a 5×10^{47} plegamientos. Si empleamos apenas lo que dura una vibración atómica (1×10^{-13} s) para ensayar cada conformación de esa proteína, iniciando desde la formación del universo, aún nos faltarían más de medio trillón de conformaciones por explorar. Luego de este razonamiento, Cyrus Levinthal concluyó que la estructura 3D de una proteína se alcanza siguiendo un camino más o menos definido (3).

Nuestro conocimiento actual de la química no permite predecir el plegamiento de una proteína, si sólo se conoce la secuencia de aminoácidos. Tal falta de conocimiento resulta una importante limitación, ya que a través de los proyectos de secuenciación masiva ha sido posible conocer la secuencia de muchísimas proteínas. Por ejemplo, en enero de 2011, una de las bases de datos mejor curada, UniProt/Swiss-Prot, contenía la secuencia completa de 524420 proteínas distintas, con una longitud promedio de 353 aminoácidos (4). En cambio, la base de datos de estructura de proteínas (PDB; 5), llegó apenas a las 70 mil entradas, entre las cuales apenas poco más de unas 40 mil son distintas entre sí, en al menos 1 aminoácido. Es decir, como máximo, conocemos la estructura de 7.8 % de las proteínas con secuencia conocida.

Por ello, es muy importante encontrar métodos acertados para predecir la estructura tridimensional de proteínas, partiendo, únicamente, de la secuencia de aminoácidos. Para tal fin es necesario recurrir a las computadoras, cuyo núcleo de procesamiento está basado en silicio, de ahí el término "in silico". En este capítulo se mencionan los métodos *in silico* que más se han aproximado a resolver este problema y sus limitaciones.

Métodos *in silico* para predecir la estructura tridimensional de proteínas

El modelado de la estructura de proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos se ha intentado mediante varias estrategias. Las estrategias más antiguas realizan la búsqueda de las diferentes conformaciones que puede adoptar una proteína, con base en la energía. Cuando los átomos de una molécula cualquiera se acomodan en el espacio, los núcleos cargados positivamente generan una cierta fuerza de repulsión entre sí (por tener la misma carga). Tal repulsión se compensa por la atracción hacia los electrones que los rodean (los cuales también se repelen entre sí) así como por fuerzas derivadas de las propiedades mecano-cuánticas de los átomos. Existen entonces acomodos de los núcleos y de los electrones que minimizan la repulsión y maximizan la atracción. Aún para unos pocos átomos, un cálculo razonablemente preciso de esta energía es muy laborioso, pero existen métodos aproximados que pueden emplearse para estimar la energía de una proteína en un cierto estado de plegamiento. Estos métodos se basan en la mecánica clásica y consisten en un conjunto de ecuaciones y parámetros conocidos como "Campo de Fuerza". Sin embargo, tienen el defecto de ignorar los llamados "efectos cuánticos", que requieren cálculos de mecánica cuántica, no clásica. En teoría, el plegamiento nativo de una proteína puede encontrarse si se ubican las conformaciones de menor energía. Desafortunadamente, aún con los campos de fuerza más eficientes, el número de conformaciones posibles no puede explorarse por completo, ni en las computadoras más poderosas, por lo que se requieren otras estrategias.

La Tabla 1 resume las cuatro clases de estrategias que se han empleado para modelar el plegamiento de una proteína a partir de su secuencia, a saber simulaciones de dinámica molecular, métodos de Monte Carlo, redes neuronales y el modelado por homología.

De entre estos métodos, las simulaciones de Dinámica Molecular (5, 6, 7), son los más seguros, porque simulan lo que ocurre en la naturaleza, sin embargo, cada paso de la simulación representa 2×10^{-12} s. Se sabe que aún péptidos de 25 aminoácidos, toman del orden de 2.5×10^{-5} s para plegarse, lo que significa rastrear las posiciones de cientos de átomos por 12.5 millones de cuadros. En una PC promedio esto tomaría varios meses, quizá años. Para una proteína de

mayor tamaño, el tiempo de cómputo aumenta exponencialmente y el problema no está al alcance de las máquinas actuales más poderosas. Los métodos "Monte Carlo" (5, 8) son aleatorios y no aseguran obtener el resultado, a menos que se disponga de muchísimo tiempo. Estos métodos han tenido éxito cuando se emplean datos experimentales para reducir el espacio de búsqueda (8). Las redes neurales (9, 10, 11, 12) son rápidas y conceptualmente simples, pero no se ha logrado desarrollar una que resuelva el problema completo y acierte con alta frecuencia. Sin embargo, se ha logrado combinarlas con métodos "Monte Carlo" para guiar la búsqueda y mejorar la probabilidad de tener una buena predicción (12). Finalmente, el modelado por semejanza u homología es el que da mejores resultados, porque consiste en usar la estructura de una proteína conocida, cuya secuencia está emparentada con la secuencia de la proteína que se desea modelar. Así, los aminoácidos coincidentes en ambas secuencias se pueden superponer en la estructura conocida y la conformación de los restantes se resuelve buscándoles acomodo en los espacios disponibles, usando como guía una función de energía. Desafortunadamente, este método sólo sirve si se tiene una estructura conocida con suficiente semejanza.

Tabla I. Estrategias usadas para tratar de predecir el plegamiento de proteínas a partir de su secuencia.

Estrategia	Programas	Características
Simulaciones de dinámica molecular	GROMACS (5), AMBER (6), NAMD (7).	Se simula la vibración y el movimiento atómico y se busca imitar el camino de plegamiento natural. Su limitación es el tiempo de cómputo requerido.
Métodos de simulación tipo "Monte Carlo"	GROMACS (5), ROSETTA "ab initio" (8).	Se hacen movimientos aleatorios y se aceptan los movimientos que conducen a una menor energía. Estos métodos garantizan hallar el resultado deseado pero a tiempos muy largos.
Redes Neurales	Predicción de estructura secundaria (9, 10, 11) y de contactos entre aminoácidos (12).	Se emplea una red de células interconectadas entre si que se pueden entrenar para dar el resultado. Se ha logrado la predicción de detalles del plegamiento, pero no de la estructura final.
Modelado por semejanza u homología	SWISS-MODEL (13, 14), SAM-T08 (15, 16), 3D-JIGSAW (17, 18), I-TASSER (19, 20), MODELLER (22).	Son los más acertados. Sólo se pueden emplear si se conoce una proteína con una estructura muy parecida a la que se espera para la proteína problema.

Para realizar un modelado por homología, se requiere un uso extensivo y conocimiento de bases de datos de estructura y de programas de cómputo adecuados. Una manera sencilla de hacer esto es emplear páginas de internet en las que estos servicios se brindan de manera automatizada. Para promover el desarrollo de métodos cada vez mejores, cada año se organiza

un concurso de modelado, llamados CASP (21), en el que los participante (programas o grupos de investigadores) tratan de modelar proteínas, cuya estructura ya se determinó experimentalmente, pero aún no se ha publicado. Los jueces (generalmente también son programas de comparación estructural) comparan los modelos enviados por los participantes con la estructura que ellos sí conocen. El ganador es quién produzca modelos muy cercanos al experimental, para el mayor número de secuencias problema. Los concursos CASP permiten identificar los métodos con mejor éxito en el modelado de proteínas.

Entre los programas automatizados ganadores en los CASP recientes están: I-TASSER (20), ROSETTA "ab initio" (8), JIGSAW (18) y SAM-T08 (16). ROSETTA está disponible en un servicio automatizado llamado ROBETTA (23). En estos servicios usted sólo tiene que someter la secuencia que desea modelar y esperar el resultado. Sin embargo, ninguno garantiza que el modelo refleje la realidad biológica, ya que para conocer la estructura real se requieren datos experimentales y se modela, casi siempre, cuando la estructura no se conoce. Es decir, la segunda parte en el modelado de la estructura tridimensional de proteínas es la validación del modelo.

Evaluando la calidad y la relevancia biológica de los modelos obtenidos

A pesar de que los métodos de modelado por homología tienen buena probabilidad de acertar, hay proteínas con secuencias semejantes y plegamientos distintos, y proteínas con secuencias distintas, y plegamientos semejantes. Además, no se dispone de referencia para las regiones en las que las secuencias de la proteína molde y la problema difieren. Cuando la semejanza de secuencia entre el molde y el problema es inferior al 42%, aumenta la probabilidad de que el modelo resultante sea inapropiado. Por ello, la evaluación de la calidad de un modelo ha sido un problema importante desde que se desarrollaron los primeros métodos de predicción de estructura de proteínas. Hay tres principios básicos para el desarrollo de estos métodos:

i) *La propiedades químicas y físicas de los aminoácidos y los contactos entre ellos.* Aquí se recurre a la física y a la química para determinar si el plegamiento propuesto tiene una energía favorable, que le brinde estabilidad. Uno de los programas más empleados es WHAT-IF (25), el cual se puede comprar e instalarse en una computadora propia, o usarse como un servicio por internet (26). WHAT-IF le permite comprobar la geometría de todos los enlaces y los contactos entre aminoácidos, detectando aquellos inaceptables, desde el punto de vista químico. WHAT-IF reporta un índice de calidad global, e índices individuales para cada aminoácido. Así se puede saber si el modelo es aceptable en todas sus partes o sólo en algunas de ellas. Un método novedoso es ROSETTA HOLES (27), en el que se analiza que tan compacta es la proteína, y determina si la distribución y tamaño de las cavidades en el modelo es semejante a lo que se observa en las estructuras conocidas a la fecha.

ii) *Métodos basados en datos estadísticos.* En estos métodos se recurre a un análisis detallado de las geometrías y contactos que presentan los aminoácidos en las proteínas con estructura conocida (PDB), ya sea tomando en cuenta sus vecinos inmediatos o no. Con dicha estadística se genera un histograma de frecuencias para cada característica de cada aminoácido (longitud de sus enlaces, ángulos de enlace, etc. para los 20 aminoácidos). Esos histogramas se pueden convertir a una función de energía usando la ecuación de Boltzman (28). La función de energía se usa ahora de manera semejante a lo descrito en el inciso anterior. Entre los indicadores de este tipo más usados está ANOLEA (29), que es la función de energía que emplea SWISS-MODEL (13) para generar sus modelos. ANOLEA puede emplearse también como un servicio por internet (30). Este servidor incluye herramientas basadas en métodos del tipo (i) para complementar el análisis.

iii) *Métodos basados en redes neuronales.* Aunque su éxito en la predicción de la estructura ha sido limitado, las redes neuronales se pueden entrenar también para calificar

modelos generados por cualquier estrategia. Estas redes han resultado robustas en la evaluación de la calidad de un modelo ya desarrollado y uno de los ejemplos recientes es PROQ (31), que está disponible para instalarse en su propia computadora o como servicio por internet (32).

Algunos métodos modernos se han desarrollado combinando estos tres principios. Por ejemplo, MetaMQAP (34), que está disponible como servicio por internet (35), recurre a varios servidores distintos y combina los resultados en un índice de calidad general. Otro método adicional que resulta muy novedoso es Rd.HMM (36), el cual combina los principios físicos y la estadística para determinar las posibles secuencias naturales que están correctamente representadas por el modelo propuesto, haciendo caso omiso de la secuencia de aminoácidos con la que el modelo fue construido (36). Así, responde a una pregunta clave: ¿Son las coordenadas tridimensionales de los átomos del esqueleto de mi proteína adecuadas para hospedar la secuencia de aminoácidos que puse sobre ellas? En otras palabras, me indica si el modelo corresponde a la realidad biológica. Este método se basa en los programas ROSETTA-design (38) y HMMer (33) y no está disponible en un servicio público, por razones de propiedad intelectual. Sin embargo, los programas para implementarlos están disponibles y no tienen costo para fines académicos. Si usted desea probar este método puede ponerse en contacto con el autor corresponsal de este capítulo.

Rd.HMM inicia por eliminar la secuencia de aminoácidos del modelo respetando sólo los átomos centrales ($-N-C_{\text{ALFA}}-C=O-$). Luego trata de resolver el problema de plegamiento inverso que es determinar la secuencia de aminoácidos a partir de una estructura, problema que parece ser más fácil de atacar que el problema directo (37). Para ello, uso el programa más robusto desarrollado para este propósito que es ROSETTA-design (38; no confundirlo con ROSETTA ab initio, ref 8). Pero en lugar de reconstruir una secuencia, se solicitan al menos un centenar de ellas. Las secuencias resultantes se amalgaman en una representación estadística llamado "modelo oculto de Markov" que es construido por el programa HMMer (33). Un modelo oculto de Markov representa un conjunto ordenado de dispositivos que emiten símbolos (aquí, los 20 aminoácidos), pero cada símbolo se emite con diferente probabilidad. Con una cierta probabilidad, un emisor puede ceder el turno al emisor siguiente, que ahora puede emitir símbolos (aminoácidos) con otra probabilidad, o cede su turno al emisor siguiente. En otras palabras, cada estado está determinado sólo por el estado inmediato anterior, pero no por los estados pasados, lo que se conoce en matemáticas como cadena de Markov y de ahí el nombre de HMM (*hidden Markov model*). HMMer resume mediante probabilidades, que aminoácidos pueden acomodarse en cada sitio de la estructura sin desestabilizar el plegamiento, por lo tanto, se puede usar para identificar, en las bases de datos de secuencias de proteínas, aquellas secuencias que coinciden a la distribución de probabilidades del HMM.

La sensibilidad de Rd.HMM es tan alta que puede diferenciar entre dos enzimas con diferente actividad, pero con plegamientos parecidos, tales como la triosa fosfato isomerasa y la fosforribosil-antranilato sintetasa (36). Si Rd.HMM encuentra la secuencia de aminoácidos de la que partió para hacer el modelo, con una calificación alta y una probabilidad de error despreciable (*Expectancia* o valor de E muy cercano a cero), su modelo realmente representa a la realidad biológica. Este método no necesita de una estructura conocida como referencia para determinar si el modelo es válido, por lo que puede usarse para estrategias de modelado que no parten de moldes. Además, es de los pocos métodos validados tanto para proteínas solubles como para proteínas de membrana, pero no es útil para proteínas muy pequeñas (menos de 90 aminoácidos) o con alta movilidad estructural (36). Rd.HMM proporciona además de la calificación global, una calificación local en forma de alineamiento (Figura 1). En un modelo correcto, dicho alineamiento no debe presentar corrimientos globales (el aminoácido número uno debe coincidir con el primer aminoácido que se toma para modelar y así sucesivamente) y no debe presentar huecos, que representan corrimientos de fase locales. Este método requiere que la geometría sea buena, pero puede tolerar algunos defectos locales, por lo que conviene combinarlo con métodos como WHAT-IF (26) o ANOLEA (30).

A) Alineamiento de T0315T556_1 a la secuencia del concurso YP_185422.1	
YP_185422.1: 1 dominio, AAs 1 al 257, Calif. 163.9, valor de E. 3.6e-43	*->paiDadthehkqdehqnqeqhfeeAkkaGvqyvliVgDnllddAkkAl iD +h ++++++ + + +A+taGv + +vG n ++A+
YP_185422. 1	MLIDTHVHLNDEQYDDDLSEVITRAREAGVDRMFVVGFNKSTIERAM 47 eiAakfqaafaavGirPedAARapkfAkerLkklAfanWvaaiggiGldn ++ + + +G +P dA + ++ e ++ lA+++ v iG +Gld
YP_185422. 48	KLIDEYDFLYGIIGWHPVDAIDFTEEHLEWIESLAQHPKVIGIGEMGLDY 97 etnrspqevqkevfrALeLAKeLGLPvviarkadeafkilmenvai + +sp +vqkevft+ + LAK+L LP++i r+a+++ + il+ee + +
YP_185422. 98	HWDKSPADVQKEVFRKQIALAKRLKLPPIIHNRATQDCIDILLEEHAEE 147 GGGvvsnfdGsaeafkfillGGLYLgfsGsvtdnGdllkkvakqapee GG++ +f Gs+e+a + + +Y+ ++G vt +n ++ k+vak+ +e
YP_185422. 148	VGGIMHSFSGSPEIADIVTNKLNFIYISLGGPVTFKNAKQPKVEAKHVSME 197 asLsssnssnnPPkkfrGYlaksafteeiirqlArllGipedkakekaae L+ ++++ P+ +rG + a +++q+A+l+G+ +++ e++ +
YP_185422. 198	RLLVETDAPYLSPPYRGRNEPARVTLVAEQIAELKGLSYEEVCEQTTK 247 AawkLlGidq<-* a kL+ +
YP_185422. 248	NAEKLFNLNS 257
B) Alineamiento deTS0315AL316_1 a una amidohidrolasa,metal-dependiente	
NP_786293.1: 1 dominio, AAs 17 al 307, Calif. 86.0, valor de E. 9.8e-20	*->daidtdGnyhPqnf...nsrpeevlefmqktnishmiLhldsPPpdy +a+ + +P+ +++++ p+ l+fm+++ is iL l sP ++
NP_786293. 17	EALKRHVPGDPDGWptpEWTpQLTLNFMRDNDISYSILSLSPHVNF 63 Giddltrkl....diledlakrfPtklGalapLPlddrdaAkk..eeaL G + t +l + +d ++ la+++P +lg la+LP+ + A k+ ++aL
NP_786293. 64	GDKAETIRLveaanDDGKSLAQYYPDQLGYLASLPiPYELDAVKtvQOAL 113 kekGalGvvvPkssnGdewGapsleevrraLasqqAivhmhptDPpt... +++GalGv vP s G +G p le+v ++L +qAiv +hp +P ++
NP_786293. 114	DQDGalGVTVPTNSRGLYFGSPVLERVYOELDARQAIVALHPNEPAIlpk 163mKqqtntfgehpnilvliphGg.... + + + + + + + + + + +m + f+++pni v+iph+G +
NP_786293. 164	nvdidlpvpllgffmdttmtfinMLKYHFFEKYPNIKVIIPHAGafIqiv 213 ..niaelllktfqndnnkvplri...vsGPtlfdllakassqFqkdlklla ++ ia+ k +q D v ++ +v+G l +l + + +ll
NP_786293. 214	ddRIAQYAQKVYQVDVYDVMHHVYfdVAGAVLPRQLPTLMSLAQPEHLLY 263 GtgtnniPrqrAkrLlerirqtnqltqekieilkRAaellllk<-* G++ +P + ++L + ++++ lt+e+ + i+ a+ +ll +
NP_786293. 264	GSDIPYTPLDGSROGLHALATDLLTNEQQAIFYDNAHRLLTE 307

Figura 1. Alineamiento proporcionado por Rd.HMM para dos modelos de diferente calidad sometidos al CASP (21). A) El mejor modelo (T0315T556_1) recuperó a la secuencia YP_185422.1, que corresponde a la del concurso, con calificación alta 163.9 y probabilidad de error 3.6×10^{-43} , y no presentó corrimientos de fase. B) El modelo defectuoso (TS0315AL316_1) recuperó a una proteína no relacionada a la del concurso, con baja calificación (86) y mayor probabilidad de error (9.8×10^{-20}), además de presentar corrimientos de fase (guiones o puntos insertados). Adaptado de la ref. 36.

Uso de Rd.HMM combinado con diversas herramientas para guiar el modelado de la estructura tridimensional de proteínas

El modelado por semejanza puede hacerse a través de servidores en Internet y también es posible emplear programas que se instalan en una computadora personal y en los que es posible dirigir el proceso considerando información adicional sobre la proteína. Uno de los programas más empleados de este tipo es MODELLER (22). Este programa resuelve el problema de acomodar los restos de aminoácidos en el espacio, correspondientes a la secuencia

problema, basándose en la estructura 3D de uno o varios posibles moldes. MODELLER presenta herramientas para realizar el alineamiento de secuencias entre el problema y el, o los moldes, pero también es posible realizar el alineamiento de manera externa y alimentarlo al programa. MODELLER tiene también varias herramientas para realizar pequeñas corridas de dinámica molecular que permiten mejorar el acomodo de las regiones de la secuencia problema que no están representadas en ninguno de los moldes disponibles. MODELLER cuenta también con una extensa documentación y permite automatizar su comportamiento mediante la ejecución de guiones (*scripts*) en lenguaje python (39).

Ejemplo de modelado 3D de proteínas con ayuda de Rd.HMM y MODELLER

Una utilidad de Rd.HMM que va más allá de la calificación de un modelo obtenido es la posibilidad de guiar la generación de un nuevo modelo. Para esta estrategia se puede proceder como sigue:

i) Obtención de estructuras 3D con semejanza de secuencia a la proteína de interés. Con el fin de ubicar uno o más moldes probables se pueden utilizar diversas herramientas bioinformáticas, como las disponibles en los sitios de NCBI (40) y EMBL (41). A través de estas herramientas, uno puede recuperar un molde del PDB que presente una semejanza de secuencia razonable con la secuencia problema.

ii) Construcción del mejor alineamiento de secuencia entre la proteína de interés y los posibles moldes. Una vez seleccionados uno o más moldes, se somete cada molde al protocolo Rd.HMM y se desafía el resultado contra un archivo que contiene la secuencia de aminoácidos original del molde y la secuencia problema. Este resultado nos proporciona una calificación global y los alineamientos. La calificación global es un indicador de la utilidad del molde. Si la secuencia problema es alineada con una calificación baja y un valor E alto, entonces el molde es inapropiado y habrá que buscar otro. Si la calificación es alta y el valor de E es cercano a cero, se emplean los alineamientos individuales de Rd.HMM para producir un alineamiento entre el molde y la secuencia de interés.

iii) Edición del alineamiento en formato PIR, según los requerimientos de MODELLER. El resultado del alineamiento Rd.HMM se edita con un editor de texto para convertirlo al formato PIR, que es el formato reconocido por MODELLER y se le añade una línea con información para MODELLER (Figura 2; 22, 37). Como datos esenciales, esta información incluye el indicador "structureX" (moldes) o "sequence" (problema), el nombre del archivo de coordenadas correspondiente, o de la secuencia (nombrada por el usuario), el aminoácido y cadena polipeptídica de inicio y final (note las palabras clave para facilitar el uso *":FIRST:A:LAST:A:"*, que significa del primero al último residuo de la cadena A). Se requieren también otros datos del cristal que pueden reemplazarse por *":undefined:undefined: 2.00: 0.200"*, (los valores no son esenciales, pero los campos deben estar). Los datos deben separarse entre sí, por dos puntos. Luego, en la siguiente línea, cada registro incluye la secuencia de aminoácidos con los huecos (guiones) que aseguran el correcto alineamiento entre secuencias, la que se termina con un asterisco. La parte inicial del alineamiento con Rd.HMM y con el método convencional (BLAST) se muestra en la figura 3, en la que se puede ver la gran diferencia en el uso de estas estrategias, ya que Rd.HMM no considera la equivalencia de propiedades químicas de un aminoácido, sino el que sean estructuralmente compatibles con el plegamiento. Los alineamientos se pueden alimentar a MODELLER, para indicar que aminoácido de la secuencia problema se debe acomodar en cada posición del archivo de estructura (1F8A o 1PIN). En el ejemplo de la figura 3, los modelos producidos con ambos alineamientos serían bastante distintos en los extremos amino de la secuencia.

iv) Calificación de los modelos obtenidos empleado Rd.HMM. Se ejecuta en MODELLER el guión de la figura 2 que indica el nombre del archivo que contiene el alineamiento y dentro de

Una vez obtenido un modelo inicial, la calificación puede ser positiva, pero sin alcanzar el valor de 0.6. Si además, el valor de E es menor a 1 y el alineamiento de Rd.HMM no tiene huecos, los modelos pueden someterse a rondas de simulación de dinámica molecular para mejorar su calidad. Si la calificación es muy baja e incluso negativa o la secuencia objetivo no aparece en la búsqueda (provisto que tal secuencia sí está en la base de datos empleada para la búsqueda) el modelo es inapropiado y hay que reiniciar el proceso. En ocasiones se obtienen calificaciones superiores a 1, casi siempre con modelos generados por ROSETTA *ab initio*. Estos valores reflejan un sesgo hacia modelos idealizados por ROSETTA, que suelen ser cercanos a la estructura correcta, pero se desvían ligeramente de las estructuras resueltas experimentalmente.

<p>A) Guiado por el Rd.HMM de 1F8A y 1PIN combinados.</p> <p>1.MSDGQETVPEGWEKRTSRSTGMTY---YLNVTKESQWDPPPTAPAEPANTNVS-----AQI-----VEPHE</p> <p>2.-----GSHGMADEEKLPPEGWEKRMSRSSGR--VYFNFHITNASQW-----ERPSGNSSSGGKNGQGEPAR</p> <p>3.-----PPGWEKRMSRSSGRVY---YFNHITNASQWERPS-----GNSSSGGKNGQG-----E-PAR</p>	
<p>B) BLAST de la secuencia objetivo contra el PDB (sitio del NCBI).</p> <p>1.MSDGQETVPEGWEKRTSRSTGMTYYLNVTKESQWDPPPTAPAEPANTNVSQAQIVEPHE</p> <p>2.MAD-EEKLPPGWEKRMSRSSGRVYFNFHITNASQWERPSGNSSSGGKNGQG---EPAR</p> <p>3.MAD-EEKLPPGWEKRMSRSSGRVYFNFHITNASQWERPSGNSSSGGKNGQG---EPAR</p>	

Figura 3. Comparación del alineamiento de secuencias de la proteína XP_313593.3 (secuencia 1) y las correspondientes a las estructuras 1F8A (secuencia 2) y 1PIN (secuencia 3). A) Alineamiento utilizando el protocolo Rd.HMM. B) Alineamiento obtenido con el programa BLAST del NCBI (40). Sólo se muestra la parte inicial de los alineamientos (lado amino), en donde ambos algoritmos son muy distintos. El alineamiento del extremo carboxilo fue igual con ambas estrategias.

La Figura 4 muestra varios modelos obtenidos por dos diversas estrategias y calificados por Rd.HMM. Se incluye aquí el modelo mejor calificado por Rd.HMM (Figura 4, panel A), que es resultante del modelado ilustrado en la figura 2, con el alineamiento presentado en la figura 3A. Este modelo resultó ser muy bueno para la proteína de la mosca común (*Drosophila melanogaster*) para la cual la calificación de Rd.HMM fue 0.41 y en este organismo la proteína ha sido identificada como una Peptidil prolil-DL-isomerasa. La proteína que se intentaba modelar aparece en la lista en el sitio 38, con una calificación de 0.20, pero un valor E aún estadísticamente significativo (los valores de E inferiores a 0.01 se pueden considerar como equivalentes a la probabilidad de error estadístico). Es decir, lo que modelamos fue la proteína de otro mosquito. Sin embargo, se puede someter el modelo a una minimización de energía con ROSETTA *ab initio* (8), mediante un protocolo llamado "*relax fast*", o, se puede someter a una simulación de dinámica molecular (5, 6, 7), para permitir que se reduzca su energía, con lo cual, el modelo se acercará a la estructura real y mejorará su calificación. Podemos ver que Rd.HMM nos proporcionó un buen alineamiento, porque nos acercó en la escala filogenética, partimos de una proteína de humano y el modelo obtenido responde ahora a una de mosquito (aunque no la del mosquito, cuya secuencia se seleccionó).

En la Figura 4 se incluyen además algunas proteínas cuya estructura tridimensional no tiene parentesco con otras estructuras depositadas en el PDB. Por ejemplo, la NADH deshidrogenasa de la membrana externa de la levadura (Figura 4, panel B); la estructura de la 5-alfa reductasa-1 de testosterona (Figura 4, panel C), que es un blanco farmacológico importante en el control de la inflamación de la próstata y la estructura de la Pirofosfatasa inorgánica soluble - dependiente de Ca^{2+} - de *Leishmania major* (Figura 4, panel), que podría ser un blanco farmacológico útil en el tratamiento de la leishmaniasis en humanos y en animales de granja. Dichos modelos se obtuvieron con ayuda del servidor SAM-T08 (15) y de estrategias de dinámica molecular usando GROMACS (5) y NAMD (7). Para las dos primeras proteínas (Figura 4 B y C) no existen datos en el PDB de proteínas relacionadas. Pero Rd.HMM nos permite saber que los modelos se aproximan a la realidad biológica.

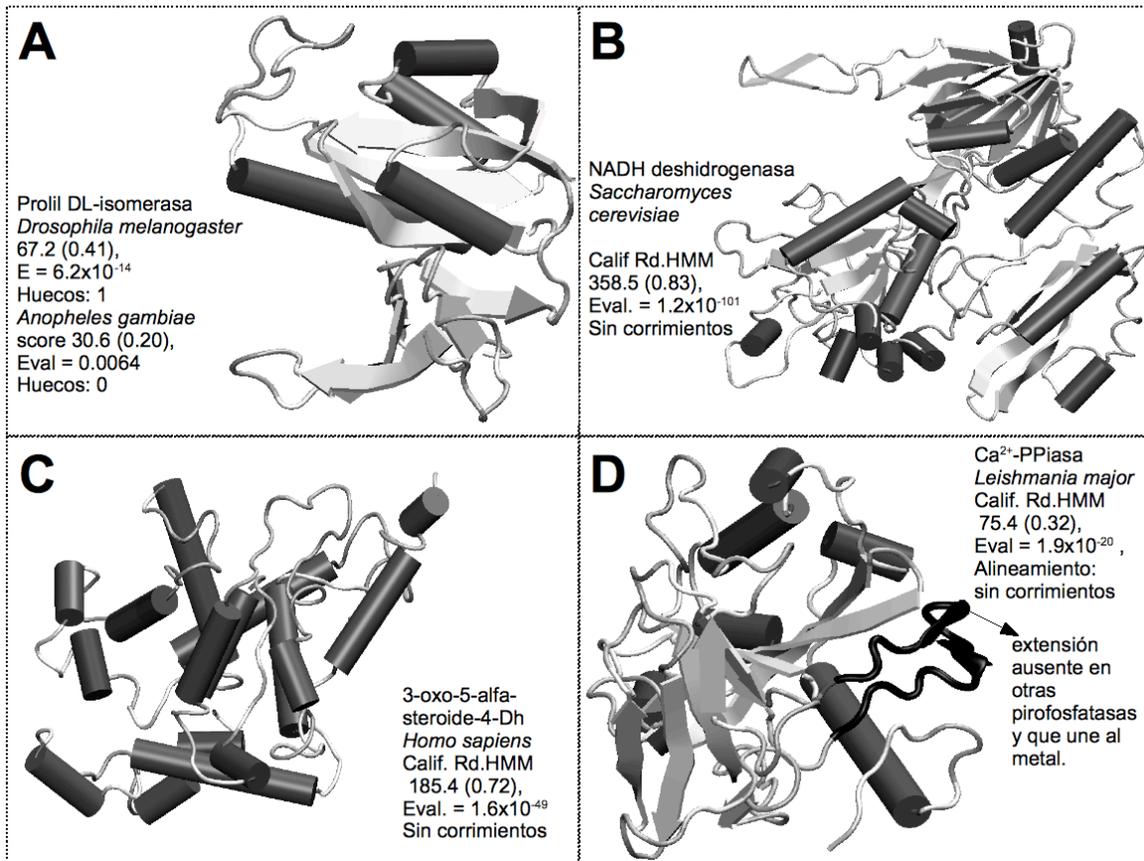


Figura 4. Modelos estructurales de diversas proteínas. A) Modelo de la proteína XP_313593.3 de *Anopheles gambiae*, a partir del alineamiento de la figura 3A, con MODELLER (22), según lo indicado en la Figura 2. B) Modelos de la NADH deshidrogenasa de la membrana externa de la mitocondria de la levadura del pan, este modelo se obtuvo del servidor SAM-T08 (15) y se minimizó su geometría con GROMACS (5). C) Modelo de la 5-alfa-esteroido reductasa-1 humana, este modelo fue obtenido mediante SAM-T08 y simulaciones de dinámica molecular de la proteína en una membrana biológica usando NAMD (7). D) Modelo de la pirofosfatasas inorgánica soluble de *Leishmania major*, dependiente de Ca²⁺. En cada modelo se incluye la calificación de Rd.HMM del modelo (Calif. Rd.HMM), el valor de la expectancia (Eval., para fines prácticos equivalente a la probabilidad de error estadístico) y la calificación dividida por la longitud de su secuencia (entre paréntesis).

Conclusión

La determinación experimental de la estructura 3D de una proteína es un proceso laborioso y complicado, que a veces, no se logra. Sin embargo, es una pieza de conocimiento esencial para entender la función de las proteínas. La secuencia de aminoácidos de una proteína resulta más fácil de determinar mediante la secuencia genómica. Por otro lado, la predicción de la estructura 3D a partir de su secuencia de aminoácidos es un problema aún no resuelto, para el que existen algunas aproximaciones. Sin embargo, se requiere de un mecanismo para validar el modelo.

De entre las estrategias disponibles, el modelado de la estructura de proteínas por homología es la de mayor éxito predictivo y es sencilla de aplicar, ya que incluso existen

servidores de internet que hacen este trabajo de modo automático. Existen también varios métodos para calificar la estructura modelada, pero, de entre ellos, sólo el método Rd.HMM (36) indica si el modelo obtenido realmente representa a la secuencia que se desea modelar, lo que nos posibilita el obtener modelos confiables de proteínas, aún si no existen proteínas con secuencias homólogas en la base de datos estructurales del PDB. Rd.HMM puede usarse además para guiar el modelado por homología y mejorar las posibilidades de éxito de la predicción. Las mejoras recientes de los métodos de modelado y validación de modelos estructurales de las proteínas, auguran que la predicción de la estructura 3D de proteínas será un problema resuelto, en el corto o mediano plazo.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero de CONACyT (CB08-11186) y DGAPA (IN210909) para el desarrollo de los métodos que se mencionan en este trabajo.

Referencias

1. The Gene Ontology Database, <http://www.geneontology.org/>, consultada el 20 de enero de 2011
2. Gene Ontology Consortium (2010) *Nucleic Acids Res.* **38**, D331-335
3. Levinthal, C. (1968) *J. Chim. Phys.* **65**, 44-45
4. UniProt Consortium (2010) *Nucleic Acids Res.* **38**, D142-148
5. Hess, B., Kutzner, C., Van der spoel, D., y Lindahl, E. (2008) *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 435-447
6. Case, D. A., Cheatham, 3rd, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, jr, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., y Woods, R. J. (2005) *J. Comput. Chem.* **26**, 1668-1688
7. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., y Schulten, K. (2005) *J. Comput. Chem.* **26**, 1781-1802
8. Kaufmann, K W., Lemmon, G. H., Deluca, S. L., Sheehan, J. H., y Meiler, J. (2010) *Biochemistry* **49**, 2987-1998
9. Pirovano, W. y Heringa, J. (2010) *Methods Mol Biol (Clifton, NJ, U. S.)* **609**, 327-48
10. Sapay, N., Guermeur, Y., y Deléage, G. (2006) *BMC Bioinformatics* **7**, 255
11. Petersen, B., Lundegaard, C., y Petersen, T. N. (2010) *PLoS One* **5**, e15079
12. Karakaş, M., Woetzel, N., y Meiler, J. (2010) *J. Comput. Biol.* **17**, 153-168
13. Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., y Schwede, T. (2009) *Nucleic Acids Res.* **37**, D387-392
14. SWISS-MODEL, <http://swissmodel.expasy.org/>, consultada el 2 de Febrero de 2011
15. Karplus, K., Karchin, R., Draper, J., Casper, J., Mandel-gutfreund, Y., Diekhans, M., y Hughey, R. (2003) *Proteins* **53 Suppl 6**, 491-496
16. HMM based protein structure prediction, http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM_T08/T08-query.html, consultada el 2 de febrero de 2011
17. Contreras-Moreira, B. y Bates, P. A. (2002) *Bioinformatics* **18**, 1141-1142
18. 3D-JIGSAW Protein Comparative Modelling Server, <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>, consultada el 2 de febrero de 2011
19. Roy, A., Kucukural, A., y Zhang, Y. (2010) *Nat. Protoc.* **5**, 725-738
20. I-TASSER server for protein structure and function prediction, <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>, consultada en 2 de febrero de 2011
21. Kryshtafovych, A., Krysko, O., Daniluk, P., Dmytriv, Z., y Fidelis, K. (2009) *Proteins* **77 Suppl 9**, 5-9
22. Eswar, N., Eramian, D., Webb, B., Shen, M.-Y., y Sali, A. (2008) *Methods Mol. Biol. (Clifton, NJ, U.S.A.)* **426**, 145-159
23. ROBETTA full-chain protein structure prediction server, <http://rosetta.bakerlab.org/>, consultada el 2 de febrero de 2011

24. Melo, F., Devos, D., Depiereux, E., y Feytmans, E. (1997) *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **5**, 187-190
25. Rodriguez, R., China, G., Lopez, N., Pons, T., y Vriend, G. (1998) *Bioinformatics* **14**, 523-528
26. WHAT-IF home page, <http://swift.cmbi.ru.nl/whatif/>, consultada el 2 de febrero de 2011
27. Sheffler, W. A. y Baker, D. B. C. (2009) *Protein science* **18**, 229-239
28. Melo, F. y Feytmans, E. (1998) *J Mol Biol* **277**, 1141-1152.
29. Melo, F. y Sali, A. (2007) *Protein Sci* **16**, 2412-26
30. SWISS-MODEL workspace, http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_structureassessment1, consultada el 2 de febrero de 2011
31. Larsson, P., Skwark, M. J., Wallner, B., y Elofsson, A. (2009) *Proteins* **77 Suppl 9**, 167-72
32. ProQ - Protein Quality Predictor, <http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.html>, consultada el 2 de febrero de 2011
33. Eddy, S. R., Mitchison, G., y Durbin, R. (1995) *J. Comput. Biol.* **2**, 9-23
34. Pawlowski, M., Gajda, M. J., Matlak, R., y Bujnicki, J. M. (2008) *BMC Bioinformatics* **9**, 403
35. Genesilico, <https://genesilico.pl/toolkit/unimod>, consultada el 2 de febrero de 2011
36. Martínez-Castilla, L. P. y Rodríguez-Sotres, R. (2010) *Plos One* **5**, e12483
37. Raha, K., Wollacott, A. M., Italia, M. J., y Desjarlais, J. R. (2000) *Protein Sci.* **9**, 1106-1119
38. Kuhlman, B., Dantas, G., Ireton, G. C., Varani, G., Stoddard, B. L., y Baker, D. (2003) *Science* **302**, 1364-1368
39. Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M.-Y., Pieper, U., y Sali, A. (2007) *Curr. Protoc. Protein Sci.* **Chapter 2**, Unit 2.9
40. Sayers, E. W., Barrett, T., Benson, *et al.* (2010) *Nucleic Acids Res.* **38**, D5-16
41. Galperin, M. Y., y Cochrane, G. R. (2011) *Nucleic Acids Res.* **39**, D1-6

Semblanza del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres



Nacido de la Ciudad de México en 1958, realizó la carrera de Ingeniería Bioquímica en el ITESM, unidad noroeste, en Guaymas, Son. y obtuvo el Doctorado en Ciencias Químicas en la UNAM en 1989, bajo la dirección de la Dra. Rosario A. Muñoz Clares. Realizó una estancia posdoctoral en el laboratorio del Dr. Michael Black, durante casi 2 años en el King's College de la Universidad de Londres, Inglaterra, entre 1991 y 1993. En este último año se incorporó como profesor de tiempo completo a la Facultad de Química de la UNAM. Desde entonces ha estudiado diversos aspectos del metabolismo de las plantas, particularmente relacionados con el

desarrollo de las semillas y el uso del fosfato. Cuenta con más de 35 artículos internacionales en revistas arbitradas con registro en el Science Citation Index, además de varios capítulos en libros, algunos artículos de divulgación de la ciencia y numerosas presentaciones en congresos, tanto nacionales como internacionales, por lo que es miembro del Sistema Nacional de Investigadores, nivel II. Su producción refleja también su espíritu de colaboración con otros investigadores, lo que le ha permitido utilizar sus conocimientos sobre enzimas y estructura de proteínas, en la investigación aplicada a la obtención de compuestos bioactivos. Ha enseñado Bioquímica para las licenciaturas de la Facultad de Química por más de 20 años, tiene amplia experiencia como profesor a nivel posgrado, en programas tanto de la UNAM como de otras instituciones. Su interés por la labor docente se refleja en que algunas de sus publicaciones caen dentro del ámbito de la investigación educativa en la enseñanza de la Cinética enzimática y la Estructura de las Proteínas. Su trabajo más reciente se centra en el modelado de la estructura tridimensional de las proteínas y, especialmente, en la validación de la relevancia biológica de los modelos obtenidos.

ANEXO

Nuevos enfoques metodológicos



Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXV, 2011, 159-172. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

APLICACIONES DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EN EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

APPLICATIONS OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE FOR PROTEIN ANALYSIS

Carlos Amero

Centro de Investigaciones Químicas - Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Av. Universidad 1001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. C. P. 62209
carlosamero@gmail.com

Resumen

La Resonancia magnética nuclear (RMN) constituye una técnica de vital importancia en la investigación científica. La RMN es, junto con la difracción de rayos X, la única metodología que puede usarse para determinar la estructura molecular de macromoléculas con alta resolución. Frente a la difracción de rayos X, no obstante, la RMN presenta varias ventajas; una de ellas es que permite determinar la estructura molecular en solución. La RMN permite, además, estudiar de manera eficaz y sencilla las interacciones entre biomoléculas. También es la única metodología que permite el estudio de la dinámica de macromoléculas con resolución atómica en varias escalas de tiempos. En este artículo se presenta una pequeña introducción a la metodología de RMN aplicada a proteínas.

Palabras clave: Resonancia magnética nuclear, proteínas, estructura, dinámica, interacciones.

Abstract

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is a technique of vital importance in scientific research. NMR is, together with X Ray diffraction, the only methodology that can be used to determine the molecular structure of macromolecules with high resolution. Nevertheless, NMR offers several advantages over X Ray diffraction; it allows to determine the molecular structure in solution. In addition, NMR allows to efficiently and easily study biomolecules interactions. And finally, it is also the only methodology allowing for the study of macromolecule dynamics with atomic resolution in several time scales. This article offers a brief introduction to NMR methodology applied to protein study.

Keywords: Nuclear magnetic resonance, proteins, structure, dynamics, interactions.

1. RMN de proteínas

Desde los inicios de la Resonancia Magnética Nuclear a mediados del siglo pasado, esta técnica ha tenido un gran desarrollo y ha adquirido, con el paso del tiempo, una importancia fundamental en el estudio de moléculas biológicas. La RMN es a menudo erróneamente considerada como una simple alternativa a la cristalografía de rayos X para la determinación de estructuras de proteínas; sin embargo, el poder y la utilidad de la RMN para el estudio de moléculas biológicas y sus interacciones se extiende mucho más allá de este uso [1]. La espectroscopia de RMN es una técnica única por sus capacidades para estudiar con resolución atómica sitios de unión de ligados, cambios conformacionales y dinámica molecular [2-4].

La aplicación de la espectroscopia de RMN requiere a menudo cantidades sustanciales de proteína, con una alta estabilidad temporal. Debido a esto, el primer paso necesario para efectuar un estudio por RMN de proteínas consiste en la optimización de la producción de la muestra (expresión, purificación y condiciones de la solución del sistema) [1,3,5]. La Figura 1, describe los pasos fundamentales para efectuar un estudio por RMN de un sistema biológico.

1.1 Preparación de muestras

La producción de cada proteína es distinta, y cada una requiere la selección de los distintos sistemas de expresión (vectores) y de las distintas técnicas de purificación (intercambio iónico, cromatografía de afinidad, etc.) [1,5,6]. Una vez que se consigue la producción y la purificación de la muestra, es necesario evaluar las condiciones en las cuales se llevarán a cabo los experimentos (amortiguadores). Es preciso seleccionar condiciones que preserven la estructura correcta y la estabilidad de la muestra por el mayor tiempo posible y que permitan, al mismo tiempo, obtener la mayor señal posible.

Algunas proteínas requieren elevadas concentraciones de iones para mantenerse estables en altas concentraciones. Sin embargo, el uso de estas altas concentraciones de sal y amortiguadores con alta conductividad degrada la relación señal-ruido en la RMN [7]. Se han propuesto varios protocolos para reducir la concentración de sal en la muestra con el fin de aumentar la sensibilidad, manteniendo la estabilidad de la misma. Algunas de estas soluciones son, por ejemplo, el aumento de la concentración del amortiguador hasta que se alcanza la fuerza iónica deseada [7], o la adición de solutos para sustituir la sal (Ej. Gly, Arg y Glu) [8,9].

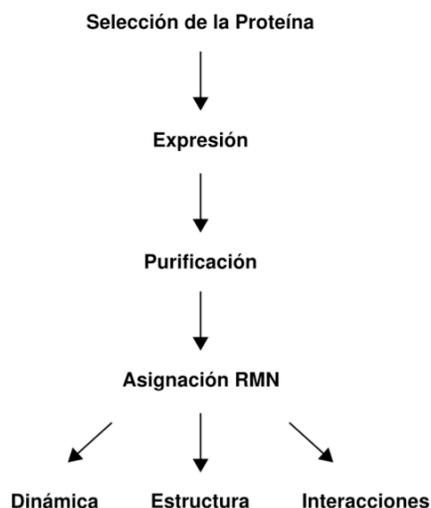


Figura 1. Esquema de los principales pasos en un estudio de proteínas por RMN. Este esquema es una sobre simplificación.

La viabilidad y la estabilidad de la muestra, en general, se pueden evaluar con un espectro de protones en una dimensión. Las señales intensas y delgadas, con una dispersión baja en el “desplazamiento químico”, a menudo son indicadores de una proteína desplegada [2,3]. También el registro de espectros de protón variando las condiciones del sistema permite determinar los amortiguadores óptimos y evaluar la señal. En la Figura 2 se muestra el espectro de una proteína plegada en una dimensión y se indican los correspondientes grupos funcionales que producen la señal.

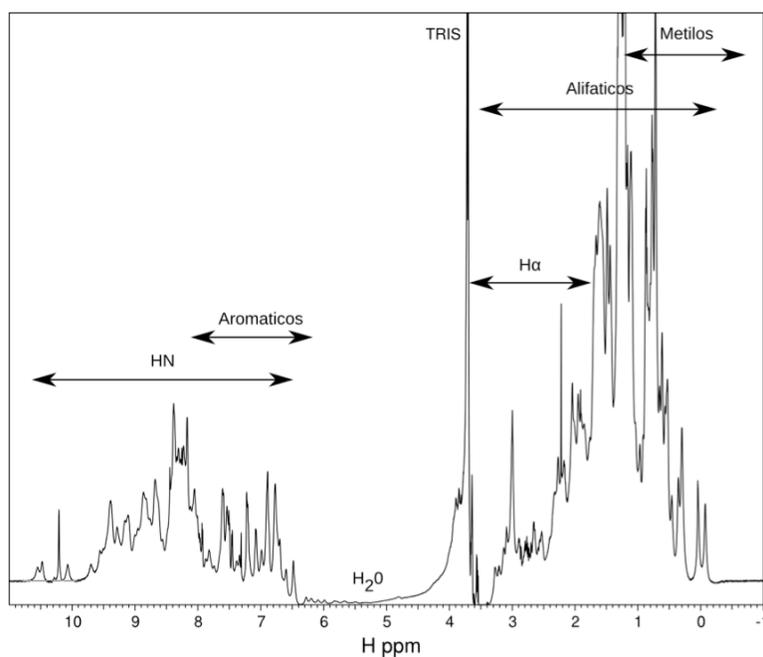


Figura 2. Espectro RMN de protón en una dimensión (Amiloidasa). Se muestran las principales regiones de un espectro de proteínas. El espectro fue adquirido en amortiguador Tris en H₂O. Supresión de agua usando esquema WATERGATE [2].

Los experimentos de RMN requieren con frecuencia un largo tiempo de adquisición (días/semanas), lo que explica que la estabilidad de la muestra sea uno de los parámetros más relevantes. Para probar la estabilidad en una proteína se pueden registrar espectros durante períodos de tiempos distintos y evaluar los cambios en la señal. Si los espectros se mantienen sin cambio con el tiempo, esto indicará que la muestra es estable. Por el contrario, la pérdida de la señal y la aparición de nuevas señales con picos delgados e intensos son indicativos de degradación, ya que los pequeños fragmentos peptídicos formados por la degradación son los que dan lugar a estas señales intensas.

Otra manera de evaluar las condiciones de la muestra para estimar el estado oligomérico de la proteína es mediante la medición del coeficiente de la difusión traslacional [10] (en base a experimentos distintos también es posible la medición del coeficiente de difusión rotacional).

A pesar de que el espectro en una dimensión es de utilidad, la espectroscopia de RMN se basa en el uso de experimentos heteronucleares multidimensionales, para los que se requiere el uso de proteínas marcadas con isótopos enriquecidos de núcleos RMN-activos (^{15}N y ^{13}C) [1,11]. Para efectuar este marcaje se necesita producir las proteínas de forma recombinante en un sistema de expresión bacteriana, en el cual se utilizan medios de cultivo mínimos con ^{15}N -cloruro de amonio y/o ^{13}C -glucosa como única fuente de nitrógeno y/o carbono, respectivamente [2,5]. Para muestras que presentan una relajación transversal rápida, normalmente proteínas de mayor peso molecular, se usa comúnmente la deuteración para reducir al mínimo las interacciones entre los espines que producen la relajación [11-13]. El método es igualmente sencillo, pero en este se requiere que la proteína sea producida en cultivos utilizando medios deuterados [11-13]. Durante la purificación, la proteína se encuentra en contacto con disolventes protonados (es decir soluciones con H_2O). Los grupos amidas son re-protonados en estas condiciones y, como resultado, se observarán señales para estos residuos.

La Figura 3 muestra un espectro ^1H - ^{15}N de correlación heteronuclear en dos dimensiones (TROSY, *transverse relaxation optimized spectroscopy* [2,3]), donde se observa una señal para cada protón unido a un nitrógeno, es decir, una señal para todos los residuos de la proteína (excepto la prolina) y algunas cadenas laterales.

1.2 Estrategias de asignación

Un requisito para casi cualquier estudio por RMN es la asignación de las señales. Este proceso consiste en la identificación de los residuos que generan cada señal en el espectro de RMN. La metodología estándar para llevar a cabo este proceso se basa en la utilización de experimentos de triple resonancia que proporcionan una correlación selectiva entre protones, carbonos y nitrógenos [14,15]. Por ende, para efectuar este tipo de experimentos, se requiere un doble marcaje (^{15}N y ^{13}C) y cada experimento tiene un tiempo de duración promedio de entre 2 y 3 días.

Estos experimentos se pueden entender como una extensión natural del espectro de correlación heteronuclear en 2D mostrado antes. Aquí, además de la correlación del protón unido al nitrógeno, también se correlacionan los distintos carbonos. De esta manera se obtiene una señal en el espectro para cada protón unido a un nitrógeno que, a su vez, está unido a un carbono [3]. La Figura 4 muestra los tipos más comunes de experimento de triple resonancia de RMN, indicando los núcleos que son correlacionados entre sí [1,2].

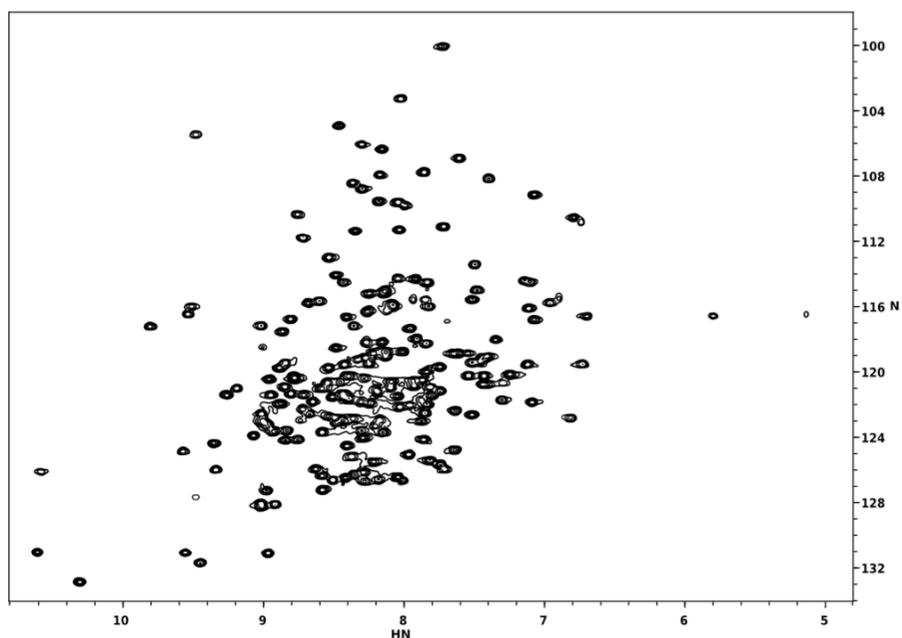


Figura 3. Espectro 2D 1H-15N TROSY NMR (Cre recombinase) a 25°C. El espectro muestra una buena dispersión, indicando que la proteína está plegada.

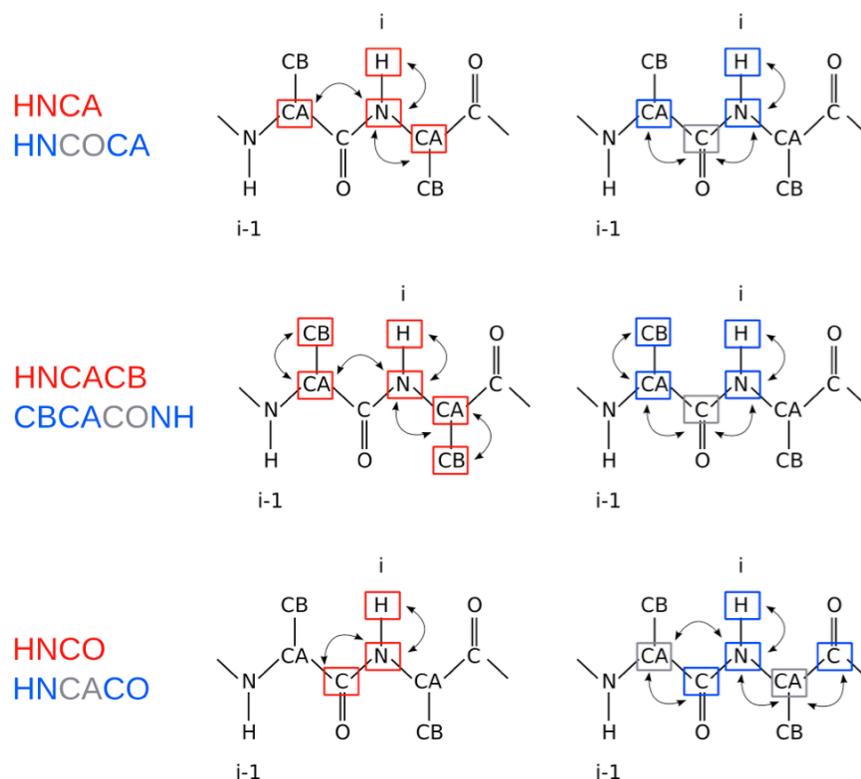


Figura 4. Experimentos típicos de triple resonancia para la asignación de la cadena principal. Los recuadros rojos y azules representan los núcleos que son correlacionados en los experimentos. Los recuadros grises representan el recorrido de la magnetización en el experimento sin la adquisición de información para estos núcleos.

Por ejemplo, el experimento HNCACB correlaciona los protones amida y los nitrógenos con los carbonos $C\alpha$ y $C\beta$ del mismo residuo (correlación intra). Así mismo, se obtiene también señal para la correlación con los carbonos de los residuos anteriores (correlación inter) (Figura 5). Por lo tanto, para cada residuo para el que se tiene una señal en el experimento de correlación en 2D, (HSQC -por Heteronuclear Single Quantum Coherence- o TROSY), se espera observar cuatro señales: la correspondiente a las correlaciones $H,N,C\alpha$ y $H,N,C\beta$ del mismo residuo; y las correlaciones $H,N,C\alpha-1$ y $H,N,C\beta-1$ con el residuo anterior (con la excepción de la Glicina, donde se esperan solamente dos señales para los $C\alpha$).

Para el análisis del experimento, los datos se muestran en forma de bandas o franjas, de forma que cada franja corresponde a una señal observada en el espectro de 2 dimensiones (Figura 3). El proceso de asignación consiste en identificar las señal para los $C\alpha$ y $C\beta$ de una franja con los correspondientes $C\alpha-1$ y $C\beta-1$ de otra franja. De esta forma se conectan entre sí distintas franjas, que corresponden a sectores de aminoácidos contiguos entre sí. Puesto que en ocasiones la señal del HNCACB es incompleta o resulta difícil distinguir entre señales correspondientes al mismo residuo o al residuo anterior. Para complementar la información se realiza normalmente el experimento CBCACONH [3]. En este experimento la transferencia de magnetización ocurre a través de los CO, con lo cual la correlación es exclusivamente entre el protón y el nitrógeno de un residuo con los $C\alpha$ y $C\beta$ del residuo anterior. Los dos espectros se suelen analizar en conjunto y se muestran como franjas alternas.

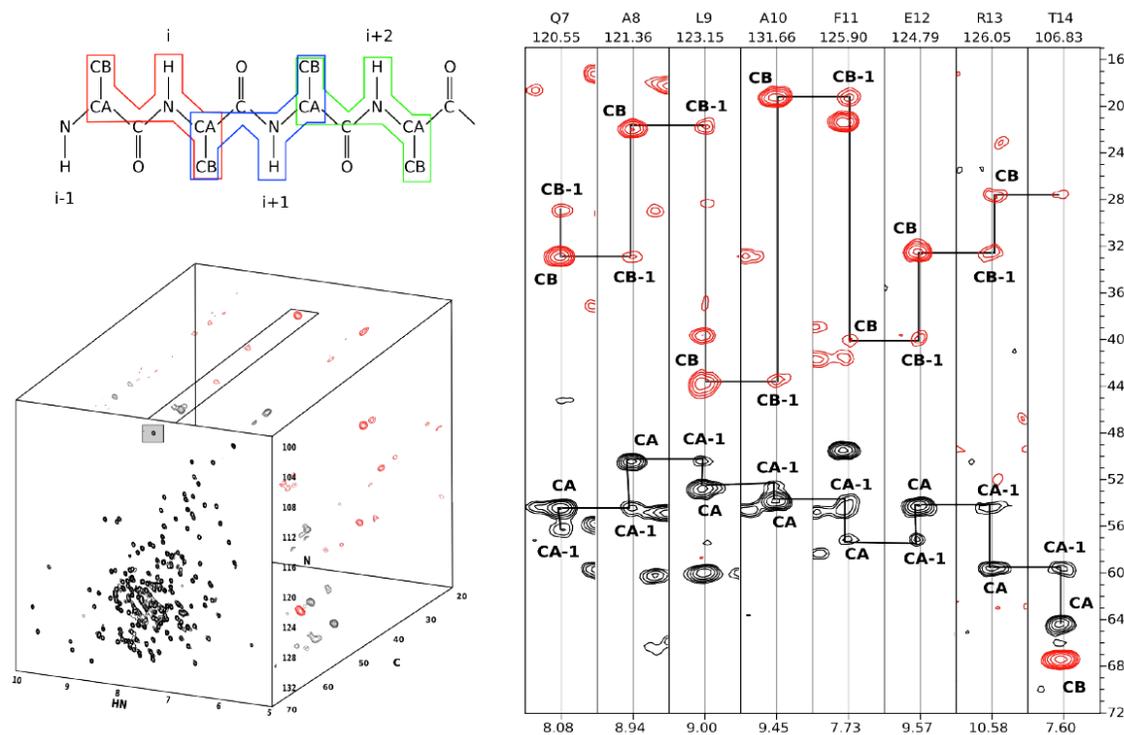


Figura 5. Esquema del proceso de asignación utilizando datos del HNCACB. El primer paso corresponde a la extracción de franjas individuales para cada señal en la proyección del $1H-15N$ plano. El proceso de asignación consiste en identificar franjas con correlación intra y franjas con correlación inter que tengan el mismo valor. Las conexiones entre franjas corresponden a fragmentos de la cadena principal polipeptídica.

Debido a que algunos residuos producen señales en sitios característicos del espectro (Figura 6), se utilizan estos datos particulares para conocer los aminoácidos de las conexiones entre franjas. Es posible, entonces, identificar algunos tipos de aminoácidos en los segmentos de conexiones y, por lo tanto, es posible determinar su posición en la secuencia. Por ejemplo, en el segmento de HNCACB que se muestra en la Figura 5, hay dos Ala y una Thr, los cuales tienen $C\beta$ características (basándonos en los valores de la Figura 6). Así se puede inferir que el segmento corresponde a la secuencia de $xAx\text{xxxT}$, donde x representa cualquier otro aminoácido. Ahora se busca dentro de toda la secuencia primaria de la proteína este patrón y, si resulta único, se pueden conocer los valores para los aminoácidos denotados por x .

En la práctica los experimentos no son perfectos y resulta necesario realizar diferentes experimentos para obtener una asignación completa de nuestra proteína. Se utilizan entonces experimentos complementarios para obtener toda la asignación de las señales de la cadena principal (Figura 4). Este paso es esencial para la continuación de cualquier análisis multidimensional de RMN (Figura 1).

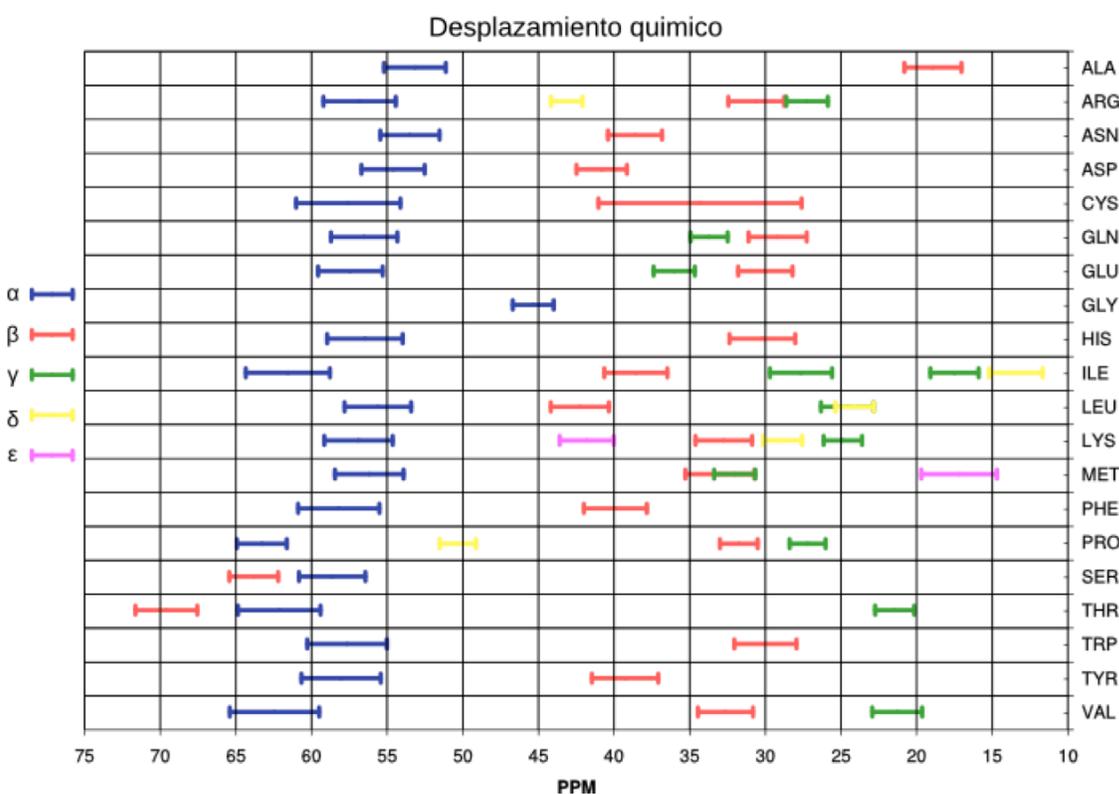


Figura 6. Valor promedio para el desplazamiento químico de los carbonos. El largo de la barra corresponde a una desviación estándar. Diferentes colores representan diferentes carbonos. Datos extraídos de BMRB [16].

1.3 Asignación de la cadena lateral

La asignación de la cadena lateral no es un requisito para analizar datos de RMN, pero sí lo es para la determinación de estructuras. Esta asignación se basa en la combinación de experimentos tipo cosy (correlation spectroscopy)/tocsy (total correlation spectroscopy) y experimentos de triple resonancia [2,3]. En estos experimentos, se correlacionan nuestros grupos aminos, ya asignados, con todos los carbonos de la cadena lateral. Como ya se tiene la asignación de los aminos, es relativamente sencillo finalizar la asignación de los carbonos.

Sin embargo, en muchos casos estos experimentos de análisis sencillo no producen buenas señales y se tiene que realizar experimentos tipo HCCH [2]. La diferencia general es que, en los experimentos descritos anteriormente, la asignación comienza desde los grupos aminos; en cambio, en estos experimentos la asignación debe de comenzar desde un protón unido a un carbono, lo cual hace que el análisis se complique substancialmente. Los experimentos tipo cosy nos dan solamente correlaciones entre núcleos contiguos, mientras que los de tipo tocsy nos proporcionan todas las correlaciones [3].

2. Determinación de estructuras

La principal fuente de información estructural derivada de la RMN sigue siendo la medición de distancias entre protones, medidas a partir de experimentos basados en el efecto de Nuclear Overhauser (NOE) [2,3]. Este efecto se debe a la interacción entre dipolos a través del espacio y es dependiente de la distancia entre los núcleos. De esta manera, al cuantificar el efecto, simplemente cuantificando intensidades de señales, se puede inferir la distancia entre núcleos y así conocer experimentalmente las distancias entre distintos residuos de la proteína. Este efecto es de corto alcance con lo cual solamente permite la medición de distancias menores a 5 Å; la magnitud del NOE es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre los núcleos ($\text{NOE} \sim 1/r^6$) [2,3]. En un experimento de NOEs, solamente obtendremos señales cruzadas para núcleos que estén cerca en el espacio (Figura 7).

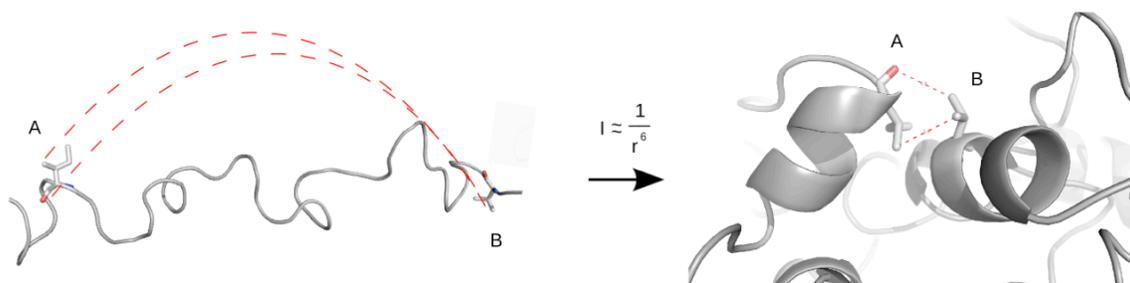


Figura 7. Ejemplo de un NOE observado en una proteína. En el espectro de NOE, se observa una señal para los residuos A-B, lo cual implica que en nuestro modelo esta distancia medida experimentalmente tiene que ser satisfecha.

Los distintos patrones observados en los experimentos NOE son indicadores de determinados elementos de estructura secundaria (Figura 8) y proporcionan una información muy valiosa que puede ser usada en el proceso de asignación [2].

Al analizar estos experimentos, se obtienen listas de distancias entre núcleos para la proteína, y estos datos experimentales tiene que ser satisfechos por un modelo estructural. Utilizando simulación por computadora [17], se introduce esta gran lista de distancias, junto con una cadena de aminoácidos totalmente desplegada, a una temperatura alta. El proceso para obtener un modelo estructural consiste en disminuir poco a poco la temperatura mientras los distintos campos de fuerza actúan (datos experimentales). Este proceso se repite varias veces obteniendo así una gran cantidad de estructuras, para asegurarse de que no se esté dentro de un mínimo local. Al finalizar este proceso se selecciona una familia de estructuras que mejor coincidan con las restricciones medidas experimentalmente. Cuando se cuenta con un gran número de restricciones experimentales de distancia, es posible por este proceso obtener el plegamiento bien definido de una proteína.

Aunque la principal fuente de información para obtener la estructura tridimensional es esta lista de distancias experimentales, es posible incluir otros tipos de restricciones estructurales utilizados en RMN, como son: restricciones angulares, enlaces de hidrógeno, acoplamientos dipolares e incluso desplazamientos químicos [17].

3. Interacciones moleculares

Una de las aplicaciones más comunes y más poderosas de la RMN biomolecular consiste en la identificación de sitios de unión de diferentes ligandos [18-20]. La determinación de estos sitios de interacción es fundamental para la comprensión de enzimas, la regulación de genes, el desarrollo de fármacos y muchos otros procesos biológicos. Aunque es posible determinar la estructura tridimensional, de nuevo, para estos complejos, por lo general esto requiere de mucho tiempo, es una operación costosa y solo es posible para sistemas donde la interacción con el ligando es fuerte, mientras que muchas interacciones biológicamente relevantes son necesariamente débiles para garantizar la reversibilidad.

Sin embargo, la espectroscopia de RMN permite determinar las interfaces de interacción de manera sencilla y rápida, sin necesidad de determinar de nuevo la estructura [1,2]. Es importante destacar que estos métodos son a menudo aplicables a sistemas de interacción fuerte y débil y pueden incluso aplicarse en grandes ensamblajes [1].

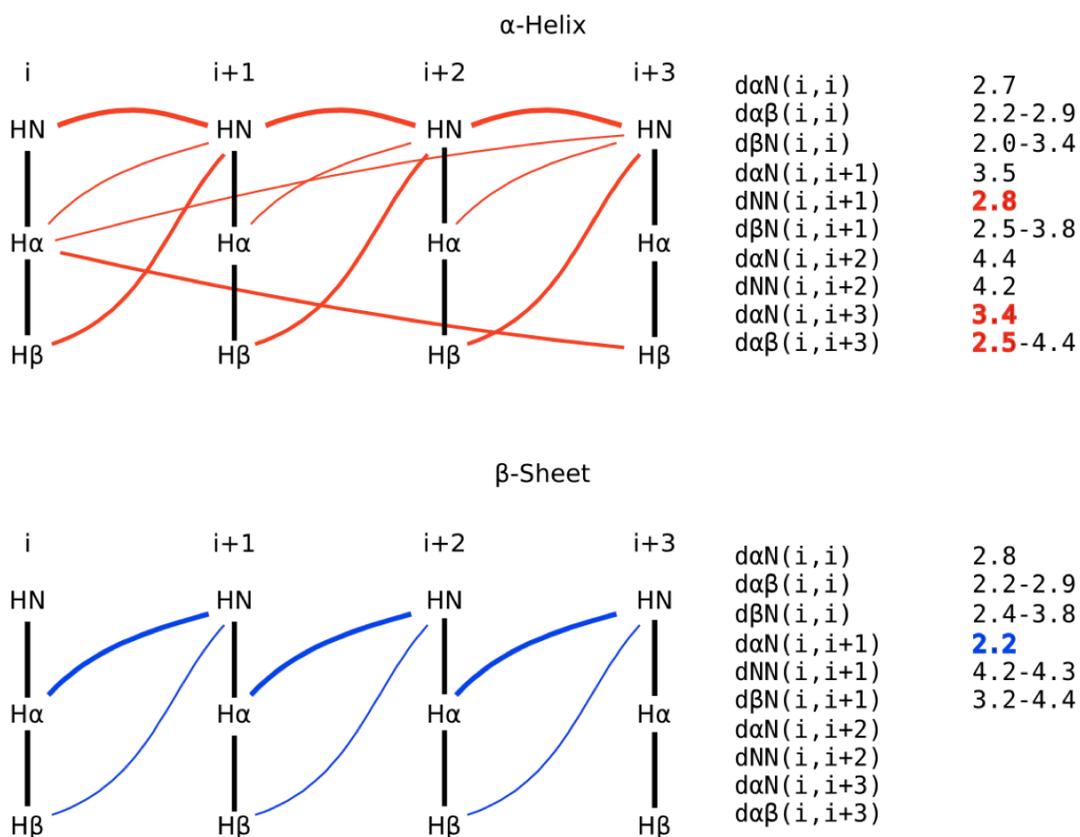


Figura 8. NOEs observados comúnmente para estructuras secundarias. Las líneas rojas y azules representan los NOEs observados en elementos de estructura secundaria, mientras que su grosor representa la intensidad. La distancias promedio entre núcleos se muestra en la tabla. Datos extraídos de BMRB [16].

La frecuencia de resonancia, es decir, la posición de la señal en el espectro de un núcleo de RMN activo es determinada por su entorno químico local, con lo cual, si este entorno químico llegase a cambiar, también lo haría la posición en el espectro. Si imaginamos una proteína que interactúa con un ácido nucleico [20] (Figura 9), es claro que los residuos en el sitio de interacción cambian de entorno químico cuando interactúan, lo cual da como resultado un cambio en la señal de los residuos interactuantes. El aspecto importante aquí es que, para los residuos que no se encuentran en la zona de interacción, el entorno químico permanece igual y, por lo tanto, también permanece igual su posición en el espectro. Esto nos permite saber qué residuos están en los sitios de interacción.

El análisis de estas perturbaciones del desplazamiento químico se efectúa mediante el registro de espectros de correlación heteronuclear de dos dimensiones (HSQC) de la molécula libre y de la molécula que interactúa con el ligando.

Debido a su versatilidad y sencillez, la perturbación espectral es quizá la técnica de RMN más ampliamente utilizada para la determinación de interfaces de enlace. Sin embargo, es importante tener en cuenta la naturaleza de la información obtenida. Si la interacción da lugar a cambios conformacionales, estos cambios darán lugar a cambios en el entorno químico y podrían producir perturbaciones espectrales para residuos lejanos a la interfaz, lo que complica el análisis. Cabe mencionar que si este es el caso, existen otros experimentos de RMN para la completa determinación de sitios de interacción [1]. Los desplazamientos químicos también pueden ser útiles en la generación de modelos estructurales de los complejos moleculares cuando se combina con la información estructural y con servidores de acoplamiento (docking).

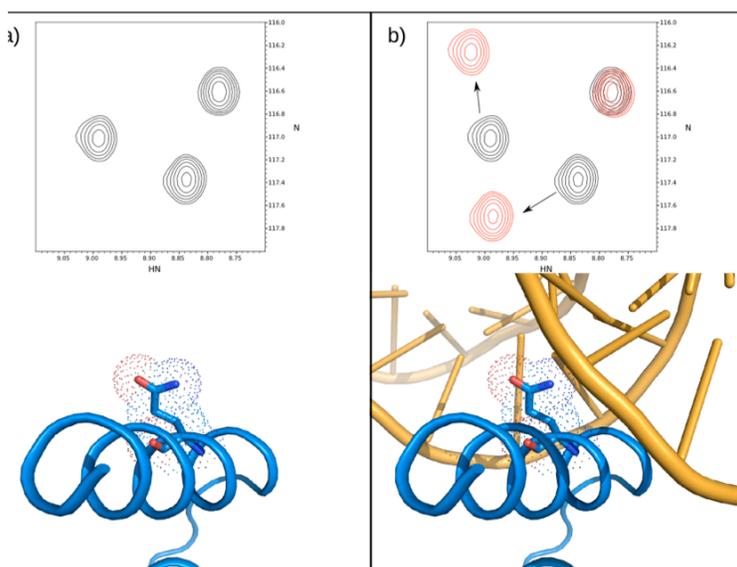


Figura 9. Esquema de experimento de perturbaciones de desplazamiento químico. a) Espectro en dos dimensiones de ^1H - ^{15}N correlación. Residuo correspondiente a las señales b) Se muestra el mismo espectro (negro) y el cambio que presenta (rojo) cuando la proteína interactúa con el ligando. Las señales de los residuos en la interface sufren una perturbación en la posición. Mientras que señales de residuos que no están en la interface permanecen en el mismo sitio.

4. Dinámica de Proteínas

Una de las mayores fortalezas de la espectroscopia de RMN es que permite la medición del movimiento molecular con resolución atómica en un gran rango de escalas de tiempo [1,21-

23]. Actualmente, comienza a ser reconocida la importancia fundamental de la dinámica para la función de una proteína. El comportamiento dinámico que afecta las funciones biológicas abarca una amplia gama de escalas de tiempo, que pueden caracterizarse experimentalmente usando una variedad de métodos basados en RMN [21,24]. Los procesos dinámicos en una enzima incluyen la re-orientación de cadenas laterales, el movimiento de asas (loops), los cambios de estructura secundaria, los movimientos de dominio, la unión del ligando, el plegado y la tasa de recambio [25,26]. Con relación a otras técnicas para estudiar la dinámica, la RMN permite el monitoreo simultáneo de todos los residuos de la proteína, además de que no existe la necesidad de insertar una sonda específica en el sistema que perturbe las propiedades esenciales de su estructura, su dinámica y su función.

Experimentalmente, el procedimiento para la medición de la dinámica molecular depende de la duración de los movimientos moleculares. La Figura 10 muestra los rangos que pueden ser estudiados por métodos de RMN y algunos de los mecanismos moleculares que requieren de movimiento para su funcionamiento.

El modelo más simple de un proceso dinámico es la interconversión entre dos estados conformaciones $A \leftrightarrow B$. Por RMN, los dos estados tienen entornos químicos diferentes, por lo que tendrán desplazamientos químicos ν_A y ν_B con una diferencia $\Delta\nu = |\nu_A - \nu_B|$ [1, 2]. Es importante mencionar que la señal en el espectro de RMN dependerá de las poblaciones de cada uno de estos dos estados, P_A y P_B , y los valores relativos de la interconversión k_B/k_A .

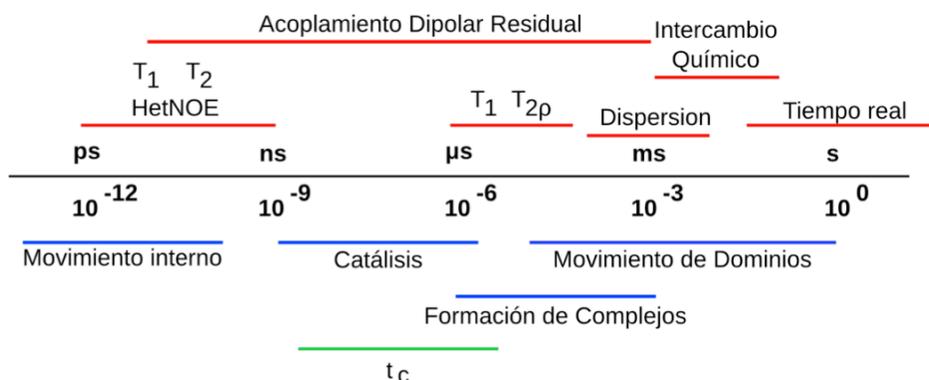


Figura 10. Escala de tiempos, desde pseg hasta segundos. Se muestran los distintos experimentos de RMN para la medición de dinámica y la línea roja representa las escalas de tiempo donde son aplicables. Los mecanismos moleculares que requieren de movimiento van acompañados de una línea azul. La línea verde representa el tiempo de correlación de las proteínas (tiempo de rotación). T_1 y T_2 corresponden a tiempos de relajación.

Ahora bien, si el cambio es lento ($k_{ex} \ll |\Delta\nu|$) las señales de ambos estados se observan, reflejando sus distintos entornos, intensidades y formas. Esto se debe a que la interconversión $A \leftrightarrow B$ no es significativa durante el período de detección del experimento de RMN. En este límite, la intensidad de cada señal nos informa directamente sobre la población de esa especie.

En el límite opuesto de intercambio rápido se observará únicamente una sola señal, que corresponde al promedio de los desplazamientos químicos y sus poblaciones. Esto se debe a que la rápida interconversión $A \leftrightarrow B$ ocurre mucho más deprisa que el experimento y la detección. En cambio, en un intercambio intermedio, la interconversión ocurre en el tiempo que se adquiere el experimento de RMN. Los novedosos experimentos de dispersión miden la dinámica en esta escala de tiempo, que corresponde a una escala de tiempo de milisegundo [27,28]. El experimento consiste en una serie de ecos en los cuales, si el entorno químico no cambia, el eco tiene como efecto que no haya cambios en la señal. Sin embargo, si al comenzar el experimento

un residuo se encuentra en una posición A y después del eco ha cambiado a un estado B, su entorno ha cambiado y el eco no produce el efecto deseado, con lo cual la señal cambia. De acuerdo a estos cambios, es posible determinar el movimiento de intercambio de $A \leftrightarrow B$ y así conocer el movimiento para cada residuo en la proteína.

Otro ejemplo de experimento para la medición de la dinámica por RMN son las mediciones en tiempo-real [29,30]. En una escala de tiempo lenta, se pretende ver el intercambio de $A \leftrightarrow B$ mientras este tiene lugar. Para este tipo de estudios, se utilizan experimentos con un tiempo de repetición corto. El objetivo es repetir el experimento mientras sucede esta interconversión y así poder describir el movimiento, esto es, describir los cambios mientras van sucediendo, puesto que los espectros van cambiando al mismo tiempo. Esta metodología ha sido utilizada con éxito para el estudio del plegamiento de proteínas [29,30].

5. Otras avances

5.1 Acoplamientos dipolares residuales

Durante la última década, se han desarrollado métodos para la medición de acoplamientos dipolares residuales (RDC) en moléculas parcialmente alineadas. Estas mediciones permiten obtener información sobre las orientaciones relativas de los distintos núcleos, dominios o moléculas [31,32].

Una gran ventaja de este enfoque experimental es que el requisito para el análisis de este tipo de información es simplemente la asignación de la cadena principal. Los acoplamientos dipolares surgen de la interacción entre dos dipolos y el campo magnético. Aunque esta interacción es dominante en los espectros de RMN en estado sólido, en solución, debido al rápido giro de las proteínas, estos acoplamientos se promedian a cero. Sin embargo, si se obliga a la molécula a tener una orientación débilmente preferencial en relación con el campo magnético externo, los acoplamientos dejan de tener un valor de cero y es posible obtener información estructural y de dinámica [19,33].

El método más común de obtener estos acoplamientos dipolares residuales es mediante la comparación de espectros de correlación del sistema libre y el sistema alineado en experimentos acoplados. La diferencia entre el acoplamiento escalar en estos dos espectros corresponde al acoplamiento dipolar [34].

5.2 Efectos paramagnéticos en la RMN

Las técnicas paramagnéticas han surgido como un complemento a la resonancia tradicional. La presencia de electrones no apareados en un ion paramagnético tiene grandes efectos sobre el espectro de RMN, proporciona un conjunto de información angular y de distancias inexistente por otras fuentes [35-38]. Estos efectos pueden detectarse como acoplamientos dipolares residuales (RDC) [39], relajación paramagnética (PRE) [39-41] y cambios de pseudocontacto químico (PCS) [39,42].

La anisotropía magnética de los iones paramagnéticos alinea parcialmente la proteína con el campo magnético externo, dando lugar a acoplamientos dipolares residuales, sin la necesidad de un medio de alineación. Mientras que el efecto de relajación paramagnética (PRE) se basa en el incremento de la relajación debida a la anisotropía magnética del ion paramagnético, este efecto depende de la distancia. De esta forma, los cambios en la relajación de cada residuo puede ser correlacionados con la distancia de cada uno de estos átomos al centro paramagnético. En la práctica, las resonancias de los residuos muy próximos al centro paramagnético sufren una relajación demasiado rápida y se pierde toda señal.

El último efecto paramagnético tiene que ver con el cambio de desplazamiento químico debido a los electrones no apareados y al momento dipolar del centro paramagnético. Este cambio en la frecuencia se llama cambio de pseudocontacto químico (PCS) y es un cambio generalmente pequeño que sólo afecta a los residuos cerca del centro paramagnético. Este cambio depende de la distancia y del ángulo, con lo cual se puede utilizar para obtener información de la proteína.

Conclusiones

La RMN ha sido una técnica de gran repercusión científica en las últimas 3 décadas y, debido al desarrollo continuo de la teoría, la instrumentación y la aparición de nuevas aplicaciones, es lógico esperar que tenga una contribución incluso mayor en el futuro. Desde el punto de vista práctico, la limitación más importante de la RMN es su poca sensibilidad, que convierte a la RMN en una técnica costosa en tiempo y en cantidad de material, aunque estas exigencias han ido reduciéndose con el tiempo. La RMN resulta también económicamente costosa debido a la tecnología necesaria para fabricar los instrumentos de alto campo magnético y las muestras marcadas isotópicamente. A pesar de estas limitaciones, la RMN sigue siendo la única técnica que puede detectar simultáneamente entre decenas y cientos de sondas por molécula, lo que permite obtener una información muy completa que no puede igualarse en estudios por medio de otras tecnologías.

Referencias

1. Downing K (Editor) (2004) *Protein NMR Techniques*, Humana Press.
2. Cavanagh j, Fairbrother j, Palmer a, Skelton N, Rance M (2006) *Protein NMR Spectroscopy 2nd edition*, Academic Press.
3. Rule, G.S. (2005) *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*, Springer.
4. Levitt, M.H. (2008) *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, Wiley.
5. Bagby, S., Tong, K.I. & Ikura, M. (2001) *Meth. Enzymol.* **339**, 20-41
6. Kremer, W. & Kalbitzer, H.R. (2001) *Meth. Enzymol.* **339**, 3-19
7. Kelly, A.E., Ou, H.D., Withers, R. & Dötsch, V. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12013-9
8. Hautbergue, G.M. & Golovanov, A.P. (2008) *J. Magn. Reson.* **191**, 335-339.
9. Lane, A.N. & Arumugam, S. (2005) *J. Magn. Reson.* **173**, 339-43
10. William S Price (1997) *Magn. Reson.: Educ. J.* **9**, 299-336
11. Lian L. Y. & Middleton D. A. (2001) *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **39**, 171-191
12. Gardner, K.H. & Kay, L.E. (1998) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**, 357-406
13. LeMaster, D.M. (1990) *Q. Rev. Biophys.* **23**, 133-74
14. Sattler, M., Schleucher, J. & Griesinger, C. (1999) *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectros.* **34**, 93-158
15. Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H. & Wüthrich, K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13585-90
16. Schwieters, C.D., Kuszewski, J.J., Tjandra, N. & Clore, G.M. (2003) *J. Magn. Reson.* **160**, 65-73
17. Zuiderweg, E.R.P. (2002) *Biochemistry* **41**, 1-7
18. Rooney, L.M., Sachchidanand & Werner, J.M. (2004) *Methods Mol. Biol.* **278**, 123-38
19. Foster, M.P., Wuttke, D.S., Clemens, K.R., Jahnke, W., Radhakrishnan, I., Tennant, L. et al. (1998) *J. Biomol. NMR* **12**, 51-71
20. Kay, L.E. (1998) *Biochem. Cell Biol.* **76**, 145-52
21. Kern, D., Eisenmesser, E.Z. & Wolf-Watz, M. (2005) *Meth. Enzymol.* **394**, 507-524
22. Kempf, J.G. & Loria, J.P. (2003) *Cell Biochem. Biophys.* **37**, 187-211
23. Kay, L.E., Torchia, D.A. & Bax, A. (1989) *Biochemistry* **28**, 8972-9

24. Subramaniam, S., Tewari, A.K., Nunes-Duby, S. & Foster, M.P. (2003) *J. Mol. Biol.* **329**, 423-439
25. Amero, C.D., Byerly, D.W., McElroy, C.A., Simmons, A. & Foster, M.P. (2009) *Biochemistry* **48**, 7595-607
26. Neudecker, P., Lundström, P. & Kay, L.E. (2009) *Biophys. J.* **96**, 2045-54
27. Palmer, A.G., Grey, M.J. & Wang, C. (2005) *Meth. Enzymol.* **394**, 430-65
28. Mizuguchi, M., Kroon, G.J., Wright, P.E. & Jane Dyson, H. (2003) *J. Mol. Biol.* **328**, 1161-1171
29. Panchal, S.C., Bhavesh, N.S. & Hosur, R.V. (2001) *FEBS Lett.* **497**, 59-64
30. Bax, A., Kontaxis, G. & Tjandra, N. (2001) *Meth. Enzymol.* **339**, 127-74
31. Prestegard, J.H., Mayer, K.L., Valafar, H. & Benison, G.C. (2005) *Meth. Enzymol.* **394**, 175-209
32. Dosset, P., Hus, J.C., Marion, D. & Blackledge, M. (2001) *J. Biomol. NMR* **20**, 223-31
33. Ottiger, M., Delaglio, F. & Bax, A. (1998) *J. Magn. Reson.* **131**, 373-8
34. Rodriguez-Castañeda, F., Haberz, P., Leonov, A. & Griesinger, C. (2006) *Magn. Reson. Chem.* **44**, 10-6
35. Liang, B., Bushweller, J.H. & Tamm, L.K. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4389-97
36. Banci, L., Piccioli, M. & Arnesano, F. (2005) *Q. Rev. Biophys.* **38**, 167-219
37. Donaire, A., Jimenez, B., Luchinat, C., Parigi, G., Piccioli, M. et al. (2001) *J. Biomol. NMR.* **21**, 85-98
38. Bertini, I., Cavallaro, G., Giachetti, A., Luchinat, C., Parigi, G. & Banci, L. (2004) *J. Biomol. NMR.* **28**, 249-261
39. Jensen, M.R., Petersen, G., Lauritzen, C., Pedersen, J. & Led, J.J. (2005) *Biochemistry* **44**, 11014-23
40. Donaldson, L.W., Skrynnikov, N.R., Choy, W., Muthiram, D.R., Sarkar, B., Forman-Kay, J.D. et al. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 9843-9847
41. Bertini, I., Savellini, G.G., Romagnoli, A., Turano, P., Cremonini, M.A., Luchinat, C. et al. (1997) *Protein. Struct. Funct. Genet.* **29**, 68 - 76

Semblanza del Dr. Carlos Amero



El Dr. Amero obtuvo la Licenciatura en Física en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el doctorado en Biofísica en The Ohio State University (OSU), en Ohio, Estados Unidos, en 2008. Su investigación doctoral se centró en la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) aplicada al estudio de proteínas. Posteriormente realizó una estancia de investigación postdoctoral de dos años en el Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (IBS), del Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) en Grenoble, Francia, donde continuó la misma línea de investigación. En 2010 el Dr. Amero regresó a México para incorporarse como profesor-investigador en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Actualmente está a cargo del Laboratorio de Bioquímica

y Resonancia Magnética Nuclear para el estudio de proteínas (www.labrmn.com).



GENÓMICA Y PROTEÓMICA FUNCIONAL, UNA NUEVA FORMA DE VER LAS COSAS

M. en C. Enrique Santos Esteban

La nueva tecnología de Análisis de Alto Contenido (HCA por sus siglas en inglés), se define como el proceso automatizado de extracción y análisis cuantitativo de datos, proporcionados por imágenes obtenidas mediante microscopía de alta resolución.

Esta revolucionaria tecnología tiene impacto en varias disciplinas:

- Investigación básica
- Biotecnología
- Investigación de nuevos compuestos con actividad biológica
- Desarrollo de nuevos medicamentos y pruebas de seguridad de los mismos

Gracias a las excepcionales capacidades de adquisición de imágenes que esta tecnología permite, es posible, ahora, realizar una examinación detallada de las imágenes celulares y subcelulares obtenidas, permitiendo así:

- Un análisis de complejos mecanismos de señalización celular
- La investigación de funciones moleculares en estados normales o patológicos
- El estudio del comportamiento celular en profundidad, correlacionando múltiples eventos y marcadores contra similares fondos fisiológicos
- La selección de nuevos blancos para fármacos o la elucidación de sus mecanismos de acción

La tecnología de Análisis de Alto Contenido, es muy adaptable y versátil, lo que le permite tener una amplia variedad de aplicaciones:

- Obtención de datos de intensidad, morfología y localización espacial de múltiples marcadores fluorescentes
- Monitoreo simultáneo, en el tiempo, de diversos marcadores, en presencia o ausencia de varios tratamientos
- Posibilidad de realizar diversos tipos de mediciones en células individuales
- Uso de diversos tipos de muestras para realizar los estudios: cultivos celulares, secciones de tejido, organismos pequeños

Decenas, Cientos e incluso miles de imágenes pueden ser capturadas y analizadas en un solo día y cada imagen contiene cientos de células. Esto hace posible realizar estudios funcionales y a gran escala, multiparamétricos, e incluso estudiando estructuras subcelulares. De esta forma, la

nueva tecnología de Análisis de Alto Contenido, permite realizar estudios donde se pueden involucrar variables a nivel genómico, proteómico o, incluso de organelos celulares y de células completas (incluso, se pueden analizar pequeños organismos completos), lo que otorga una mayor complejidad de los estudios y con ello mayor información y de mayor calidad.



PRINCIPIOS Y APLICACIONES DEL RNA DE INTERFERENCIA

M. en C. Laura Alejos Velázquez

El RNA de interferencia y los procesos que conllevan su función, sirven como un sistema de regulación en todos los organismos eucariontes. Estas son secuencias cortas de RNA de 21 pb que degradan o reprimen la expresión de RNAs homólogos.

Actualmente tenemos una comprensión mayor de las moléculas y procesos que están involucrados en el sistema de RNA de interferencia, su especificidad de reconocimiento y degradación del RNA mensajero homólogo y muchos de los requisitos clave que se requieren para diseñar moléculas efectivas de RNAi.

Además, con la secuencia completa del genoma humano y la disponibilidad de organismos modelos ya estudiados, ahora es posible escoger la secuencia de RNA que degrade selectivamente el mRNA de un gen de interés, modificando un fenotipo o llevando a una pérdida de función sin afectar a otros genes relacionados.

El estudio del RNAi se ha convertido por tanto en una herramienta poderosa que ha revolucionado los estudios de expresión de genes, análisis de pérdida de función o sobre expresión, identificación y la validación de blancos con propósitos terapéuticos. De igual forma, los estudios de RNA de interferencia *in vivo*, mantiene una enorme promesa en aplicaciones médicas.



EL USO DEL MULTIPLEXING COMO HERRAMIENTA EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

D. en C. Samuel García Nieto
Product Manager-Bioscience
Merck-Millipore
México

samuel.nieto@merckgroup.com

www.millipore.com/mx - www.merck-chemicals.com.mx

Merck-Millipore is a division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany

La técnica del multi-análisis o multiplexing se basa en la capacidad de detectar y cuantificar múltiples analitos en la misma muestra. En otro tipo de metodologías como ELISA o Western Blot, solo se puede analizar un analito a la vez lo cual implica una mayor inversión de tiempo en la obtención de resultados.

El poder obtener múltiples resultados en un solo ensayo provee una alternativa valiosa en el ahorro de recursos y tiempo, aspectos ampliamente valorados en cualquier laboratorio de investigación.

El multiplexing, basado en la tecnología xMAP® (Multi Analyte Profiling) de Luminex, es una metodología que involucra el uso de tres áreas de especialidad específicas: detección de fluorescencia avanzada, manufactura de micro-esferas de precisión y conjugación covalente de reactivos a las micro-esferas. Con esta tecnología, los ensayos biológicos o bioensayos se llevan a cabo en la superficie de las microesferas en lugar del fondo de un pozo. Una vez que el ensayo ha sido completado, es entonces procesado con un analizador Luminex que combina láseres, óptica avanzada, sistema de fluidos y procesamiento digital de la señal para generar resultados en forma rápida y precisa. En nuestro caso, empleamos anticuerpos como los reactivos de captura y detección, permitiendo que este inmuno-ensayo sea el que nos permite cuantificar los analitos de interés.

Esta tecnología permite la detección de múltiples analitos, permite el uso de cantidades mínimas de muestra (entre 5 – 50 μ l), tiene una sensibilidad muy alta (en muchos casos <1 pg/ml) ofreciendo resultados rápidos y reproducibles.

La introducción de la tecnología xMAP® nos ofrece una técnica 100% comparable con las técnicas tradicionales como ELISA o Western Blot. Los valores obtenidos en ambas técnicas mantienen una correlación muy alta proveyendo un factor más de decisión a favor del multiplexing.

Otra de las ventajas de esta plataforma es que se pueden utilizar otro tipo de biomoléculas como reactivos de captura y detección como sondas de DNA solo por mencionar una, lo cual permite realizar ensayos tipo micro-arreglos en experimento de este tipo.

Merck-Millipore como uno de los socios comerciales de Luminex, la compañía creadora de la tecnología xMAP®, tiene el portafolio más completo de paneles para el análisis multiplexing, con kits que permiten la cuantificación de citocinas y quimiocinas, biomarcadores de cáncer, moléculas involucradas en enfermedades neurodegenerativas, paneles de especialidad como sepsis, proteínas reguladoras del metabolismo como insulina, grelina o adiponectina entre muchas.

Espectrometría de Masas: Una herramienta esencial para la identificación y caracterización de biomarcadores

Un Biomarcador se conoce como una característica somática específica o un cambio biológico medible relacionado con un estado de salud o enfermedad, con una enfermedad o con un conjunto de ellas. Se entiende por biomarcador, “una característica que es medida y evaluada de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales o patológicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”. Además, se puede utilizar para monitorear el progreso de la enfermedad o los efectos de un tratamiento.

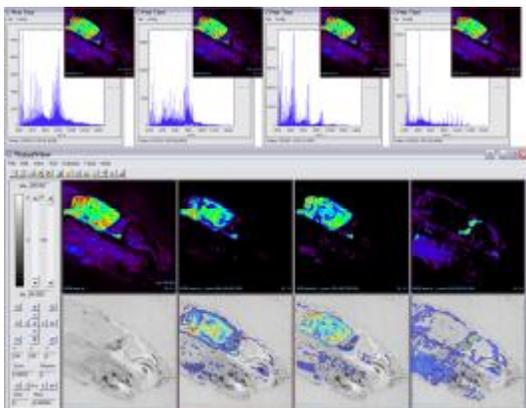
La naturaleza del biomarcador puede ser muy diversa y podemos encontrar proteínas, péptidos, lípidos ⁵, carbohidratos, oligonucleótidos ⁶ o combinaciones entre estos, por lo que uno de los objetivos principales en el estudio de los biomarcadores es su identificación y caracterización. No menos complejo es su origen (suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, tejidos, líneas celulares, etc.). Así mismo su abundancia natural es comúnmente muy baja (en comparación con los componentes comunes de la muestra). Por ello, uno de los requisitos indispensables para clasificar una molécula como biomarcador es que pueda ser medida objetivamente al inicio o durante el desarrollo del proceso biológico. Para lograr lo anterior, es necesario el uso de técnicas o metodologías de fraccionamiento o aislamiento para poder detectar más eficientemente al biomarcador ⁷ y utilizar técnicas e instrumentos altamente sensibles para su identificación, caracterización y medición.

Una de estas técnicas es la espectrometría de masas que, desde el inicio de la búsqueda de biomarcadores, se ha vinculado esencialmente con el descubrimiento y caracterización de los mismos. La espectrometría de masas tiene un potencial mayor que las técnicas de inmuno-ensayo en las que puede resultar muy difícil eliminar las interferencias entre péptidos en las mezclas altamente complejas que resultan de la digestión de proteínas. Otra gran ventaja de la Espectrometría de masas es que nos permite ir al siguiente paso en el estudio de biomarcadores: la cuantificación.



AB SCIEX TOF/TOF™
5800 System

Para esto, la espectrometría de masas ha sido un excelente complemento por la necesidad de utilizar una gran variedad de software analíticos e integrativos para los análisis ³; junto con el gran poder de especificidad, linealidad en la cuantificación, rapidez y robustez de los espectrómetros de masas. Además, mediante el empleo de nuevas metodologías de análisis basadas en imágenes bidimensionales de espectros de masas generadas por el espectrómetro de masas (Mass Spectrometry Imaging [IMS o MSI]) sobre un tejido u órgano en específico corroborar la presencia y ubicación del biomarcador, o su expresión diferencial ⁵.



Recientemente, los estudios de biomarcadores están basados en utilizar técnicas poco invasivas recolectando muestras de pacientes como suero o plasma y poder monitorear diversos componentes que nos indiquen el progreso de enfermedades o la eficacia de un tratamiento ⁷. Diversos estudios han sugerido el empleo de distintos espectrómetros de masas para realizar este proceso de una manera simple, pasando de la identificación de proteínas a la validación/cuantificación del biomarcador, en poco tiempo, sin necesidad de utilizar complejas técnicas de marcaje, múltiples técnicas de fraccionamiento, o el diseño de anticuerpos específicos para su caracterización ⁵. Esto es posible gracias a que se aprovecha la complejidad natural de la muestra y se toma ventaja de la alta eficiencia y reproducibilidad de la cromatografía líquida con la velocidad, sensibilidad y especificidad del espectrómetro de masas, utilizando escaneos específicos y dirigidos (targeted) contra el o los biomarcadores.

En diversos estudios han ligado el uso de espectrómetros de masas 4800 *plus* o 5800 MALDI TOF-TOF™ o híbridos doble cuadrupolo con tiempo de vuelo (5600 TripleTOF™ o QSTAR Elite™) para el

descubrimiento de los biomarcadores. Así como el empleo de instrumentos de triple cuadrupolo (Triple Quad™) o híbridos (QTRAP®) para la cuantificación y validación del biomarcador, mediante el empleo de escaneos altamente sensibles y específicos, Multiple Reaction Monitoring (escaneos MRM) como su base, ligados con escaneos EPI (Enhanced Product Ion) para su cuantificación y secuenciación simultánea ². La utilización del Espectrómetro de masas TripleTOF™ 5600 para el descubrimiento, caracterización y validación de biomarcadores, puede hacer que se realice todo lo relacionado a los biomarcadores con un solo instrumento, gracias a su gran velocidad de análisis (hasta 100 escaneos MS/MS a resolución de 15,000) y poder hacer Qual/Quant en un solo escaneo.



chiPLC-Nanoflex-Based Nano Proteomics:
Nano 2D-LC™ + 5500 QTRAP®



SelexION™

Durante la platica veremos algunos ejemplos de cómo utilizar a los diferentes espectrómetros de masas 4800 *plus* MALDI TOF-TOF™ 4, AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 o el AB SCIEX TripleTOF™ 5600 ² para el descubrimiento de los posibles candidatos a Biomarcadores. Finalizando, con un ejemplo del uso de diferentes software de análisis junto con escaneos MRM para el proceso de validación de una serie de biomarcadores utilizando un espectrómetro de masas 4000 QTRAP® LC/MS/MS ².



Bibliografía:

- 1 – "Análisis de las proteínas humanas y de sus aportes al laboratorio clínico" Acta Bioquim. Clin. Latinoam. V44 n.1 La Plata ene/mar 2010 version On-line ISSN 1851-6114.
- 2 – Ueda K, Saichi N, Takami S, Kang D, Toyama A, Daigo Y, Ishikawa N, Kohno N, Tamuta K, Shuin T, Nakayama M, Sato T.A., Nakamura Y, Nakagawa H (2011) "A comprehensive peptidome profiling technology for the identification of early detection biomarkers for lung adenocarcinoma" *PLoS ONE* 6 (4): e18567.
- 3 – AB SCIEX Tech Note: "MarkerView™ Software 1.2.1 for Metabolic and Biomarker Profiling Analysis" Publication Number: 090210-01.
- 4 – AB SCIEX Tech Note: K. Williams, K. Blease, L. Wong, C. Lombardo "Biomarker discovery in the time dependant progression of lung fibrosis" Publication Number: 0922410-01.
- 5 – Thomas A, Lenglet S, Chaurand P, Deglon J, Mangin P, Mach F, Steffens S, Wolfender J.L., Staub C (2011) "Mass Spectrometry for the evaluation of cardiovascular diseases based on proteomics and lipidomics" *Thromb Haemost* 106.
- 6 – Weng H, Shen C, Hirokawa G, Takahashi R, Shimada K, Kishimoto C, Iwai N (2011) "Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction" *Biomedical Research* 32 (2).
- 7 – Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Novello JC, Marangoni S, Turck CW, Dias-Neto E (2009) "Proteome Analysis of schizophrenia patients Wernicke's area reveals an energy metabolism dysregulation" *BMC Psychiatry* 9.
- 8 – Kim MJ, Frankel AH, Tam FWK (2011) "Urine proteomics and biomarkers in renal disease" *Nephron Exp Nephrol* 119.



Odyssey® Infrared Imaging System.

La empresa LI-COR Biosciences es una empresa líder en la detección de western blot por fluorescencia; y visualización de imágenes en infrarrojo cercano. La fluorescencia cercana al infrarrojo (NIR, por sus siglas en inglés) proporciona una sensibilidad igual ó mayor que la quimioluminiscencia, dando una señal de ruido, una detección multiplexado y una sensibilidad que cualquier sistema fluorescente. Por otra parte, debe mencionarse que la fluorescencia cercana al infrarrojo resulta ser una mejor opción que la fluorescencia en el rango de luz visible. Las membranas y los plásticos pueden producir una señal de ruido alta en la región de la luz visible, debido a la autofluorescencia y a la dispersión de luz de los materiales. Esto limita la sensibilidad de la fluorescencia visible, y hace que sea casi imposible de detectar las proteínas de baja abundancia (en el caso del western blot).

El equipo *Odyssey® Infrared Imaging System* explota las ventajas que ofrecen la fluorescencia del infrarrojo cercano, reduciendo drásticamente la autofluorescencia y dispersión de la luz. Entre las ventajas que ofrece el equipo son la detección precisa de señales fuertes y débiles en un amplio rango. Además con el equipo no se requieren sustratos, soluciones reveladoras nocivas, ó películas fotográficas; asimismo no se necesita de un cuarto oscuro. Es importante mencionar que a diferencia de la fluorescencia, en la quimioluminiscencia se emplean muchos reactivos fotográficos que son altamente tóxicos, no son biodegradables; además de que algunos de ellos son tratados con ozono ó peróxido.

El equipo Odyssey® es un sistema constituido por dos canales de detección independientes: un canal de 700 nm de longitud de onda, y otro canal de 800 nm de longitud de onda. La compañía LI-COR Biosciences ofrece los fluoróforos IRDye® que al ser empleados como marcadores en sondas ó anticuerpos, permiten optimizar la detección de dos blancos simultáneamente en la misma

membrana ó en las mismas células. Debe mencionarse que las señales de los IRDye en las membranas son estables por tiempo indefinido, si se almacenan correctamente; por lo que se pueden visualizar posteriormente.

El sistema *Odyssey*® se ha utilizado para muchas aplicaciones, tales como: detección cuantitativa de geles de proteína (con IRDye blue protein stain), visualización de geles de DNA (empleando SYTO®60), western blot cuantitativo, western on-cell, western in-Cell, western in-gel, northern blot, southern blot, ELISA/FLISA (con IRDye Streptavidina), ensayo de cambio de gel/EMSA (ensayo de movilidad electroforética), arreglo de proteínas, detección de glicoproteínas, ensayos de proteasa, ensayos de factor de transcripción, ensayo de gen reportero y la visualización de sección de tejidos ó de pequeños animales (como ratas o ratones).



Química Valaner S. A. de C.V.
Jalapa No. 77, Col. Roma,
Del. Cuauhtémoc. México, D.F.
C.P. 06700,
Tel 5525 5725, 5207 3404
www.valaner.com

Mensaje Bioquímico

La presente obra se terminó de imprimir el 3 de julio de 2011 en *J. Jesús Miranda Osornio/Hemes Impresores*, Cerrada de Tonantzin No. 6, Col. Tlaxpana, México D. F. 11370. 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 50 ejemplares más sobrantes para reposición.

PORTADA

Alegoría del Espacio Escultórico, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México.

DISEÑO

Ismael Bustos Jaimes