



Memoria del XL Taller de Actualización Bioquímica



Facultad de Medicina, UNAM
Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina



Mensaje Bioquímico XXXVII



40

Aniversario

Editores: A. Butanda, A. Guevara, J. Guevara, D. Matuz, E. Rendón, H. Vázquez.

Vol. XXXVII, 2013

ISSN 0188-137X

Instrucciones para autores

La publicación en esta revista es sólo por invitación a los conferencistas del Taller de Actualización Bioquímica.

La extensión de los manuscritos se sugiere que sea de 15 a 20 cuartillas a espacio y medio en un procesador de textos computarizado (de preferencia WORD), utilizando letra arial 12 puntos y empleando los criterios estándar del mismo procesador, como es margen y tamaño de hoja carta. La versión electrónica del manuscrito será entregada vía electrónica al Editor principal encargado de su trabajo.

En la primera hoja, escriba a media cuartilla el título del trabajo en letras mayúsculas, luego el nombre del autor o los autores (sin grado académico), el sitio de trabajo y su dirección; deje seis espacios e inicie el texto. Cuando haya punto y aparte, separe los párrafos por dos espacios; los subtítulos se escriben sin sangría, dejando tres espacios arriba de éste y dos por debajo. Deberá incluirse un resumen en español y otro en inglés, ambos seguidos de un máximo de 5 palabras clave; además de los apartados que el (los) autor(es) consideren pertinentes para desarrollar el tema. Las citas de las referencias dentro del texto deberán aparecer con número progresivo, entre paréntesis cuadrados y con un máximo de 100. Para la presentación de las referencias se utilizará el formato establecido por The Journal of Biological Chemistry, se anexan ejemplos:

1. MacDonald, G. M., Steenhuis, J. J. y Barry, B. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8420-8428
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Se sugiere que haya un máximo de 10 ilustraciones (tablas, figuras y fotografías), de excelente calidad para evitar problemas de impresión. Por razones de economía requerimos que el uso de color se mantenga al mínimo y que éste sólo se use cuando sea absolutamente necesario. Enumere las tablas con números romanos y las figuras con números arábigos. Las ilustraciones con sus respectivos pies de figura deben de ir insertados en el manuscrito en el lugar preferido por el autor.

Se recomienda no utilizar pies de página. Las abreviaturas que sean muy específicas y utilizadas en el texto reiteradamente, deberán enlistarse en la primera página. Se sugiere revisar el último Volumen del "Mensaje Bioquímico" para ver detalles del formato (<http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/MensajeBioquimico/>).

Finalmente se le solicita al conferencista invitado que anexe una breve semblanza curricular propia y su fotografía.

Nota: Por tratarse de un evento académico desarrollado con el único fin de divulgar los avances de las ciencias bioquímicas, es de hacer notar que ni los conferencistas ni el comité editorial reciben remuneración alguna por su trabajo.

Instructions for authors

Publication in this journal is available only by invitation to guest speakers of the Workshop Updates on Biochemistry (*Taller de Actualización Bioquímica*).

The extension of the manuscripts suggested to be of 15-20 pages with double spacing on a computerized word processor (preferably WORD), using Arial 12 point and using the standards of the same processor, such as margin and size leaf letter. The electronic version of the manuscript will be delivered electronically to the principal editor in charge of their work.

On the middle of the first page write the paper title in capital letters, then the name of the author or authors (no degree), the workplace and its postal address; leave six spaces and start the text. When full stop, separate the paragraphs with two spaces, the subtitles are written without bleeding, leaving three spaces above it and two below. Manuscript should include an abstract in Spanish and in English, both followed by a maximum of five keywords; The author(s) should add the number of sections considered relevant to develop the theme. The quotations from the references within the text should appear with progressive number, in brackets, with a maximum of 100. For the presentation of the references used the format established by The Journal of Biological Chemistry, examples are given:

1. MacDonald, G.M., Steenhuis, J.J. and Barry, B.A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8420-8428
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

It is suggested a maximum of 10 illustrations (tables, figures and photographs), of high quality to avoid printing problems. For reasons of economy, authors are required to keep the use of color to a minimum and to use it only when absolutely necessary. List the tables with Roman numerals and figures with Arabic numerals. The illustrations with their respective figure captions should be inserted in the manuscript at the place preferred by the author.

It is recommended not to use footnotes. The abbreviations that are very specific and repeatedly used in the text, must be declared in the first page. We suggest reviewing the last Volume of the "Mensaje Bioquímico" for details of the format (<http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/MensajeBioquimico/>).

Finally the guest speaker is asked to attach a brief biographical sketch of its own curriculum and a photograph.

Note: As this is an academic event developed for the sole purpose of disseminating the advances in biochemical sciences, it should be noted that neither the speakers nor the editorial committee receive remuneration for their work.

MENSAJE BIOQUÍMICO es una revista académica arbitrada de publicación anual, editada por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Interior de la Ciudad Universitaria, México, D.F., 04510. Indizada en LATINDEX y PERIÓDICA. Ni la Facultad de Medicina ni la UNAM son responsables por las opiniones vertidas por los autores. Se prohíbe la reproducción parcial o total del contenido sin previa autorización. Comité Editorial: ARMANDO BUTANDA (1), ALBERTO GUEVARA, JORGE GUEVARA, DEYAMIRA MATUZ, ERIKA RENDON (2) y HÉCTOR VÁZQUEZ. (1) Instituto de Fisiología, UNAM; (2) Departamento de Biología Celular y Tisular. Todos los demás editores pertenecen al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Número de Certificado de Licitud de Título (5552). Número de Certificado de Licitud de Contenido (4295). Número de Reserva al Título de Derechos de Autor (648-91). Distribuido por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Impreso en *J. Jesús Miranda Osornio/Hemes Impresores*, Cerrada de Tonantzin No. 6, Col. Tlaxpana, México D. F. 11370. *Foto: Alfonso Olmedo García.*

MENSAJE BIOQUÍMICO

MENSAJE BIOQUÍMICO

EDITORES:

DR. ARMANDO BUTANDA OCHOA

DRA. ERIKA RENDON HUERTA

DR. JORGE GUEVARA FONSECA

DR. ALBERTO GUEVARA FLORES

M. EN C. DEYAMIRA MATUZ MARES

M. EN C. HÉCTOR VÁZQUEZ MEZA

ORGANIZADO POR:

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,

FACULTA DE MEDICINA, UNAM

VOL.: XXXVII

2013

5 de Junio de 2013 a 4 de Junio 2014

Mensaje Bioquímico

D.R. © 2013 por Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.
Facultad de Medicina

ISSN-0188-137X

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

Impreso y hecho en México
Printed and made in Mexico

ÍNDICE

EDITORIAL	VII
AGRADECIMIENTOS	XI
PROGRAMA	XII
Dr. Marco A. Juárez Oropeza <i>Homenaje in memoriam al Dr. Guillermo Mendoza Hernández</i>	1
Dr. Oscar Juárez <i>“La NADH deshidrogenasa dependiente de sodio: estudios mecanísticos y papel fisiológico”</i>	17
Dr. Mauricio Díaz Muñoz <i>“Adaptaciones cronostáticas del metabolismo hepático en un modelo experimental de alimentación temporalmente restringida”</i>	41
Dra. Araceli Díaz Cruz <i>“Mecanismos de daño y neuroprotección en la lesión traumática de la médula espinal”</i>	69
Dra. Mari Paz Sánchez Jiménez <i>“El control epigenético en el desarrollo de las plantas a través de PcG y TrxG”</i>	109
Dra. Marie-Catherine Boll <i>“Biomarcadores en pacientes con enfermedad de Parkinson”</i>	127
Dra. María Rosa Ávila Costa <i>“Inhalación de manganeso como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson”</i>	140
Dr. Jorge Vázquez Ramos <i>“Ciclinas D y CDKs en el inicio de la germinación de maíz”</i>	160
Dr. Miguel Ángel Mayoral <i>“Participación de O-glicanos tipo mucínico y galectina-3 en las metástasis cerebrales de origen mamario”</i>	184
Dr. Gabriel López Velázquez <i>“Las crónicas de Giardia: el parásito, la molécula y el fármaco”</i>	196

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta <i>“Papel de la obesidad y radicales libres en la función cardio vascular del óxido nítrico.”</i>	213
Dr. Félix Luna Morales <i>“Nuevos moduladores del desarrollo celular en los ovarios de los mamíferos”</i>	225
Dr. José Luis Rosales <i>“Proteína tirosina fosfatasa de Entamoeba histolytica”</i>	241
Dra. Ruth Jaimez Melgoza <i>“Estrógenos de uso clínico”</i>	261
Dra. Martha Patricia Coello Coutiño <i>“Transducción de señales mediada por cinasas de la familia SnRK”</i>	275
Dr. Víctor Valdés <i>“Apuntes sobre genómica”</i>	292



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

Editorial

Pendant opera interrupta minœque murorum ingentis.

Virgilio

El primer Taller de Actualización Bioquímica (TAB) se realizó del 25 al 29 de mayo de 1974; de acuerdo a los datos publicados por la Dra Yolanda Saldaña en el número especial de agosto de 1997 del Boletín de Educación Bioquímica, los 64 asistentes (representando 13 universidades) solicitaron que se realizara el Taller de forma anual. La organización del evento (y subsecuentes) estuvo a cargo del Dr. Enrique Piña, como Jefe de departamento, los doctores Magdalena Carrillo Santín, Guillermo Alvarez Llera y la Dra Saldaña. El compromiso adquirido por el Departamento de Bioquímica se ha cumplido y desde entonces se ha realizado anualmente el TAB, donde se han presentado avances relevantes de la bioquímica por investigadores de reconocido prestigio que han compartido su experiencia en la investigación y la docencia. Este es el Taller de Actualización Bioquímica número XL. Motivo de celebración y de reflexión que permite ver la perspectiva que en aquella época los organizadores del primer evento consideraron como alternativa para favorecer el desarrollo de muchos profesores e investigadores jóvenes. Como cada año veremos a amigos y colegas, como gran familia nos reunimos en este evento académico. Este año sin embargo, el sitio de dos pilares del Departamento de Bioquímica estarán esta vez, vacíos: el Dr Guillermo Mendoza y el del Dr Jesús Guzmán. De manera prematura y mientras se desarrollaba el XXXIX Taller de Bioquímica, recibimos la noticia del fallecimiento prematuro de un gran amigo y compañero: Guillermo Mendoza Hernández. La vida de un amante de su trabajo y fanático de la estructura de proteínas, un hombre noble y congruente con su vocación de servicio, fue segada cuando se dirigía a su laboratorio. El Dr Marco Antonio Juárez Oropeza, nos reporta en esta oportunidad la ruta de un Bioquímico Mexicano, Homenaje *in memoriam* al Dr. Guillermo Mendoza Hernández a quien se dedica este año el Taller. La cita de Virgilio en la Eneida, que nos recuerda que los trabajos

interrumpidos, quedan en suspenso, como muros que se elevan como poderosas amenazas.

Recientemente falleció el Dr Jesús Guzmán García, químico bacteriólogo y parasitólogo y Doctor en Bioquímica por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Realizó un posdoctorado en el Institute Hormel de la Universidad de Minnessota en 1965. Fué invitado por el doctor José Laguna y se incorporó al Departamento de Bioquímica en 1957 como profesor de tiempo completo, donde realizó parte de su carrera científica y que voluntariamente suspendió publicando su último artículo científico en 1972, para dedicarse a la administración académica. El Dr Guzmán fue secretario de Ciencias Básicas en la Facultad de Medicina (1971-1974). En 1974, fue el primer director de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Cuautitlán. Fue designado profesor emérito, el 15 de diciembre de 1993, de la Facultad de Química.

En el programa científico del Taller contamos con la aportación del Dr. Tarik Issad del Depto. de Endocrinología del Instituto Cochin, de Paris Francia, quien nos presenta algunos aspectos relevantes de la modificación postraduccional por la adición de N-acetilglucosamina sobre residuos de serina o treonina de proteínas citosólicas o nucleares. Este proceso, denominado O-GlcNAcilación es interesante porque es muy dinámico y es análogo a la fosforilación de proteínas. Regula la estabilidad, la actividad o la localización celular de diversas proteínas y la modificación reversible, de manera importante depende de la concentración de glucosa y constituye un poderoso mecanismo por el cual la actividad celular puede ser regulada por el ambiente nutricional, en el trabajo que nos presenta hace una evaluación de la implicación de la GlcNAcilación en la diabetes y el cáncer.

Los proyectos de secuenciación masiva han permitido, de manera importante, entender una multiplicidad de procesos biológicos y entender mejor los mecanismos utilizados por las bacterias patógenas para llevar a cabo la infección. El grupo de los doctores Oscar Juárez y Blanca Barquera del Departamento de Biología, Centro de Biotecnología y Estudios Interdisciplinarios, del Instituto Politécnico de Rensselaer NY, abordan los aspectos fisiológicos relacionados con los gradientes transmembranales de la NADH deshidrogenasa dependiente de sodio y su participación en los mecanismos de sobrevivencia e infección de bacterias patógenas.

El Dr Mauricio Díaz-Muñoz y su grupo, del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología, Juriquilla, Querétaro, nos presentan el trabajo sobre el acceso restringido a la alimentación como un sistema experimental para estudiar la regulación circadiana del metabolismo durante el ciclo ayuno-realimentación. La actividad fisiológica es influida por el reloj circadiano y se ha identificado que el control principal de esta ritmicidad es ejercido, en los mamíferos, desde el hipotálamo, sin embargo, existe un reloj alternativo denominado oscilador sincronizado por el alimento (OSA) que en lugar de responder a la luz, es sincronizado por la accesibilidad al alimento. En esta revisión se hace un compendio de las principales adaptaciones endócrinas y de los cambios bioquímicos del hígado que

acompañan la expresión del OSA y confirman la presencia de la relación entre el reloj molecular y las redes metabólicas, con influencias mutuas y complementarias.

La lesión de la médula espinal (LTME) por traumatismos genera daño irreversible sobre la función neurológica. Este problema ha sido identificado en jóvenes, principalmente en los varones, es un problema de salud pública y a pesar del esfuerzo de diferentes grupos el desarrollo de estrategias neuroprotectoras eficaces que logre restablecer la función neurológica perdida ha sido poco alentadora. Considerando que los principales mecanismos de daño traumático implican excitotoxicidad, estrés oxidante, respuesta inflamatoria y la muerte celular por apoptosis La Dra. Araceli Díaz Ruiz Investigadora del Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez S.S.A, hace una recapitulación de los principales mecanismos de daño secundario que se activan durante la etapa aguda después de ocurrida una LTME y que son claves para establecer blancos terapéuticos eficaces con el uso de terapias farmacológicas neuroprotectoras.

En *Arabidopsis* la función dinámica de Los complejos trithorax (TrxG) y Polycomb (PcG) provoca cambios en la estructura de la cromatina para controlar varios procesos de su desarrollo. La Dra María de la Paz Sánchez del Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México presentan interesantes resultados que muestran que mientras TrxG cataliza la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) para mantener la eucromatina, el complejo PcG cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) para mantener la heterocromatina, lo que indica el control epigenético en el desarrollo de las plantas a través de PcG Y TrxG.

El sistema inmune posee códigos de reconocimiento que permiten regular la respuesta inmune, esta ocasión el Dr. Gerardo R. Vasta de la Escuela de Medicina de la Universidad Maryland, un gran amigo de la UNAM y ferviente amante de la arqueología mesoamericana, nos presenta diversos modelos que confirman que el sistema inmune innato posee mecanismos de reconocimiento específicos mediante códigos generados por la organización de carbohidratos. Este tipo de reconocimiento en la respuesta inmune innata han sido conservados evolutivamente y se tienen evidencias que pueden ser explorados para regular la respuesta inmune de mamíferos. Y nos presenta sus resultados en el estudio de las interacciones proteína-carbohidrato en inmunidad innata: aspectos moleculares, estructurales y funcionales.

Existen diferentes marcadores para el diagnóstico eficiente y desde las primeras etapas de la enfermedad de Parkinson (EP), las Doctoras Marie-Catherine Boll y Nora E. Kerik Rotenberg del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, presentan una revisión exhaustiva de los biomarcadores más utilizados en la actualidad, que permiten determinar la progresión de esta enfermedad, así como la respuesta a los tratamientos. En relación también a la enfermedad de Parkinson (EP) los modelos animales de esenciales para la evaluación de terapias adecuadas. Aunque el estudio de la EP en modelos animales tiene limitaciones debido a los cuidados intensivos después de la administración de ciertas neurotoxinas El grupo de la Dra María Rosa Avila Costa del Departamento de Neurociencias e la FES- Iztacala presenta sus resultados en el

modelo de inhalación de manganeso como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, logrando la inducción de la muerte bilateral y progresiva de las neuronas de la Sustancia Nigra compacta, lo que confirma que este es un modelo adecuado para el estudio de la EP, sensible, reproducible y de fácil aplicación, con el cual pretendemos brindar una herramienta más para el estudio de la enfermedad así como la evaluación de nuevos tratamientos.

Los doctores Silvia Karina Godínez Palma y Jorge M. Vázquez Ramos de la Facultad de Química de la UNAM, presentan su trabajo sobre ciclinas D y CDKs en el inicio de la germinación del maíz. Este modelo de germinación de semillas es apto para estudiar ciclo celular dado que, a la entrada de agua, se reanuda el metabolismo que quedó detenido durante el proceso de desecación en la formación de la semilla. Las ciclinas tipo D y la interacción de las correspondientes proteínas con diferentes CDKs, al ser fundamentales para la percepción de un estado metabólico constituye un modelo importante para evaluar el ciclo celular de un organismo que como el maíz, posee numerosos genes codificantes de ciclinas D, lo que permitirá confirmar la importancia de estas proteínas para la germinación y el ciclo célula.

La participación de O-glicanos tipo mucínico y galectina-3 en la metástasis cerebral de origen mamario es evaluada en el trabajo del grupo del Dr. Miguel Mayoral de la Facultad de Medicina y Cirugía así como del Centro Multidisciplinario de Investigación UABJO-UNAM. Los mecanismos de desarrollo de metástasis que es la más grave complicación del cáncer y la principal causa de muerte por esta enfermedad podrían estar asociadas a las modificaciones en la glicosilación de proteínas de las células tumorales que al interactuar con lectinas endógenas específicas por galactosa podrían favorecer la transformación celular, migración y metástasis.

Las crónicas de Giardia. El parásito, la molécula y el fármaco, es el trabajo presentado por el grupo del Dr Gabriel López-Velázquez del Instituto Nacional de Pediatría y su grupo, está basado en que *Giardia lamblia* es un parásito que se considera aún como de divergencia temprana de la giardiasis. Considerando que este parásito ha desarrollado resistencia a antiparasitarios este proyecto está enfocado a la búsqueda de blancos terapéuticos para el diseño de fármacos anti-giardíacos.

La obesidad representa un serio problema de salud, que se asocia con enfermedades metabólicas, en el trabajo Implicaciones Fisiopatológicas de la Interacción del Oxido Nítrico y Radicales Libres de Oxígeno, Ana María Gámez Méndez, Amelia Ríos y Bruno Escalante de la Unidad CINVESTAV Monterrey, identifican que cambios en la concentración plasmática de especies reactivas de oxígeno se han asociado tempranamente en el desarrollo de la obesidad y que esto repercute en el desarrollo de patología renal. La presencia de radicales libres de oxígeno generados en la etapa inicial de la obesidad pueden ser muy importantes en la reducción de óxido nítrico. Cuando hay daño renal disminuye la disponibilidad de óxido nítrico, lo que impide al tejido renal ajustar cambios hemodinámicos para mantener la filtración glomerular, favoreciendo así insuficiencia renal de forma prematura.

El grupo del Dr. Félix Luna de la Facultad de Ciencias Químicas, BUAP, Puebla, nos presentan nuevos moduladores propuestos para el desarrollo celular en los ovarios de los mamíferos. El desarrollo de los folículos del ovario pueden ser regulados entre otros por las neurotrofinas a través de sus propios receptores. La liberación de las neurotrofinas depende del ion Ca^{2+} que proviene de canales iónicos así como la proteína codificada por el gen FXNA, así como el transcrito del gen ARL6ip identificado en el ovario de la rata en etapa fetal. Los receptores TRPV1 y los genes FXNA y ARL6ip han sido propuestos como nuevos reguladores del desarrollo folicular del ovario, por lo que en esta revisión se presentan los principales mecanismos de acción de estas proteínas en las células de los ovarios de la cobaya y la rata.

A pesar de la relevancia de la familia de las proteína tirosina fosfatasas (PTP) en el control de prácticamente todos los aspectos de los procesos celulares, su importancia funcional en la señalización celular no ha sido claramente establecido. El grupo de la Dra Ana Lilia Ramírez Tapia del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV nos presentan su trabajo sobre las proteína tirosina fosfatasas, EhPTPA, EhPTPB, EhPRL y EhPTPLMW, de *Entamoeba histolytica* y el papel de estas proteínas en la fisiología del parásito y en los mecanismos de patogenicidad.

Los estrógenos son hormonas esteroideas que participan en múltiples procesos fisiológicos, la disminución de estrógenos durante la menopausia ha generado la necesidad de diseñar estrategias clínicas para reemplazarlos sin embargo actualmente se utilizan compuestos con actividad estrogénica para el tratamiento de la menopausia y sus consecuencias vasculares y óseas, en la anticoncepción asociados a progestinas, así como para el tratamiento y profilaxis del cáncer de mama dependiente de estrógenos, principalmente en este trabajo la Dra . Ruth Jaimez Melgoza del Departamento de Farmacología de la facultad de Medicina nos hace referencia a los estrógenos de uso clínico como el estradiol micronizado, las sales de estradiol, estrógenos conjugados equinos, etinilestradiol, mestranol, raloxifeno, tamoxifeno y fulvestrant.

La familia de las cinasas SnRKs (Sucrose non-fermenting related kinases), toman su nombre de su homólogo en levadura, SNF1, que funciona como un regulador global del metabolismo. En *Arabidopsis thaliana*, la familia SnRK consta de 38 miembros y está dividida en tres subfamilias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3. Las SnRK1 tienen una distribución muy amplia y participan en muchos procesos, dentro de los que destacan la regulación del metabolismo de nitrógeno y carbono. Las SnRK2 y SnRK3 son cinasas exclusivas de plantas que coordinan las respuestas a estreses osmótico y salino. En esta revisión las Dras Alejandra Avila, Eleazar Martínez y Patricia Coello del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, describen las características estructurales y funcionales de la familia de las SnRKs, así como su participación en diversos procesos metabólicos y celulares. El Dr. Víctor Valdés López del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias de la UNAM nos presenta la evaluación sobre la relevancia del desarrollo de técnicas de secuenciación masiva. Estas técnicas han permitido analizar

las secuencias y comprender la estructura, regulación, funcionamiento, interacciones y evolución de los genes y genomas realizar la secuenciación de genomas completos lo que favorece obtener una visión global, que se integra con la información derivada de genes particulares.

El desarrollo del Taller de Actualización Bioquímica se desarrolla con la decidida participación de sus organizadores, Jorge Guevara Fonseca, Armando Butanda Ochoa, Erika Rendón Huerta, Alberto Guevara Flores, Deyamira Matuz Mares y Héctor Vázquez Meza, a quienes el Departamento de Bioquímica reconoce el gran esfuerzo realizado en esta actividad. Lic Horacio Arroyo Diazconti, quien desde este año substituye al C.P. Pedro Hernández (finado), Rosa Ma López, Marivel Rojas García, Rodolfo Escutia y el Lic. Fernando Farfán, ha sido de gran relevancia para la organización de este Taller.

Dr. Edgar Zenteno Galindo

Junio, 2013

AGRADECIMIENTOS

La realización de este evento ha sido posible gracias al apoyo que nos ofrece la Facultad de Medicina a través del Director, el Dr Enrique Graue y la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, Secretaria General. La actividad profesional que han mostrado los organizadores durante la historia de estos 40 TAB, ha sido dignamente representada esta vez por los Dres. Jorge Guevara Fonseca, Armando Butanda Alberto Guevara Flores Deyamira Matuz Mares, Héctor Vázquez Meza, y Ericka Rendón Huerta, quien amablemente ha accedido a participar en esta organización en un segundo período.

. De manera especial, agradecemos a la **Dra. María Leoba Castañeda Rivas** Directora de la Facultad de Derecho de la UNAM, por su apoyo en la disposición de la Aula Magna “Jacinto Pallares” donde se realiza por sexto año consecutivo el Taller de Actualización Bioquímica. Al mismo tiempo agradecemos el apoyo logístico al personal académico y administrativo de la Facultad de Derecho por las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones de dicha facultad.

Por la difusión oportuna del Taller de Actualización Bioquímica 2013 agradecemos al **Dr. Hugo E. Huitrón Vera**, Director de la Gaceta, UNAM, a la **Sra. Martha Marín Zapata**, Jefa del Departamento de Información y Prensa de la Gaceta de la Facultad de Medicina y al Personal a su cargo, en particular a la **Lic. Rocío Muciño Ramirez**. Además de todo el apoyo de la **Imprenta de la Facultad de Medicina** por la impresión de los posters y trípticos para la difusión de nuestro evento.

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

XL TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna “Jacinto Pallares”, Facultad de Derecho, UNAM
29, 30 y 31 de julio de 2013

Hora	Lunes	Martes	Miércoles
8:30-9:00	Inauguración		
9:00-10:00	Dr. Marco A. Juárez Oropeza Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. <i>Homenaje in memoriam al Dr. Guillermo Mendoza Hernández</i>	Dr. Gerardo R. Vasta Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine <i>“Interacciones proteína- carbohidrato e inmunidad innata: aspectos moleculares, estructurales y funcionales”</i>	Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta CINVESTAV, Monterrey. <i>“Papel de la obesidad y radicales libres en la función cardio vascular del óxido nítrico.”</i>
10:00-11:00	Dr. Oscar Juárez Center for Biotechnology and Interdisciplinary Studies, Rensselaer Polytechnic Institute. <i>“La NADH deshidrogenasa dependiente de sodio: estudios mecánicos y papel fisiológico”</i>	Dra. Marie-Catherine Boll Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. <i>“Biomarcadores en pacientes con enfermedad de Parkinson”</i>	Dr. Félix Luna Morales B. Universidad Autónoma de Puebla. <i>“Nuevos moduladores del desarrollo celular en los ovarios de los mamíferos”</i>
11:00-11:30	RECESO		
11:30-12:30	Dr. Tarik Issad Instituto Cochin, Departamento de Endocrinología, Francia. <i>“Implicación de la O-GlcNAc glicosilación en la diabetes y el cáncer”</i>	Dra. María Rosa Ávila Costa FES Iztacala. <i>“Inhalación de manganeso como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson”</i>	Dr. José Luis Rosales CINVESTAV, Zacatenco. <i>“Proteína tirosina fosfatasa de Entamoeba histolytica”</i>
12:30-13:30	Dr. Mauricio Díaz Muñoz. Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla. <i>“Adaptaciones cronostáticas del metabolismo hepático en un modelo experimental de alimentación temporalmente restringida”</i>	Dr. Jorge Vázquez Ramos, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. <i>“Ciclinas D y CDKs en el inicio de la germinación de maíz”</i>	Dra. Ruth Jaimez Melgoza Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM. <i>“Estrógenos de uso clínico”</i>
13:30-15:00	COMIDA		
15:00-16:00	Dra. Araceli Díaz Cruz Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. <i>“Mecanismos de daño y neuroprotección en la lesión traumática de la médula espinal”</i>	Dr. Miguel Ángel Mayoral Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. <i>“Participación de O-glicanos tipo mucínico y galectina-3 en las metástasis cerebrales de origen mamario”</i>	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. <i>“Transducción de señales mediada por cinasas de la familia SnRK”</i>
16:00-17:00	Dra. Mari Paz Sánchez Jiménez Departamento de Ecología Instituto de Ecología, Funcional, UNAM. <i>“El control epigenético en el desarrollo de las plantas a través de PcG y TrxG”</i>	Dr. Gabriel López Velázquez Instituto Nacional de Pediatría. <i>“Las crónicas de Giardia: el parásito, la molécula y el fármaco”</i>	Dr. Víctor Valdés Facultad de Ciencias, UNAM. <i>“Apuntes sobre genómica”</i>

XL TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna “Jacinto Pallares”, Facultad de Derecho, UNAM
29, 30 y 31 de julio de 2013

LUNES

8:30 Registro e Inscripciones

8:50 Inauguración

Conferencias

9:00-10:00

Dr. Marco A. Juárez Oropeza

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Homenaje in memoriam al Dr. Guillermo Mendoza Hernández

10:00-11:00

Dr. Oscar Juárez

Center for Biotechnology and Interdisciplinary Studies, Rensselaer Polytechnic Institute.

“La NADH deshidrogenasa dependiente de sodio: estudios mecanísticos y papel fisiológico”

11:30-12:30

Dr. Tarik Issad

Instituto Cochin, Departamento de Endocrinología, Francia.

“Implicación de la O-GlcNAc glicosilación en la diabetes y el cáncer”

12:30-13:30

Dr. Mauricio Díaz Muñoz.

Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla.

“Adaptaciones cronostáticas del metabolismo hepático en un modelo experimental de alimentación temporalmente restringida”

15:00-16:00

Dra. Araceli Díaz Cruz

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

“Mecanismos de daño y neuroprotección en la lesión traumática de la médula espinal”

16:00-17:00

Dra. Mari Paz Sánchez Jiménez

Departamento de Ecología Instituto de Ecología, Funcional, UNAM.

“El control epigenético en el desarrollo de las plantas a través de PcG y TrxG”

XL TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna “Jacinto Pallares”, Facultad de Derecho, UNAM
29, 30 y 31 de julio de 2013

MARTES

Conferencias

9:00-10:00

Dr. Gerardo R. Vasta

Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine

“Interacciones proteína-carbohidrato e inmunidad innata: aspectos moleculares, estructurales y funcionales”

10:00-11:00

Dra. Marie-Catherine Boll

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

“Biomarcadores en pacientes con enfermedad de Parkinson”

11:30-12:30

Dra. María Rosa Ávila Costa

FES Iztacala.

“Inhalación de manganeso como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson”

12:30-13:30

Dr. Jorge Vázquez Ramos,

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

“Ciclinas D y CDKs en el inicio de la germinación de maíz”

15:00-16:00

Dr. Miguel Ángel Mayoral

Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.

“Participación de O-glicanos tipo mucínico y galectina-3 en las metástasis cerebrales de origen mamario”

16:00-17:00

Dr. Gabriel López Velázquez

Instituto Nacional de Pediatría.

“Las crónicas de Giardia: el parásito, la molécula y el fármaco”

XL TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna “Jacinto Pallares”, Facultad de Derecho, UNAM
29, 30 y 31 de julio de 2013

MIÉRCOLES

Conferencias

9:00-10:00

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

CINVESTAV, Monterrey.

“Papel de la obesidad y radicales libres en la función cardío vascular del óxido nítrico.”

10:00-11:00

Dr. Félix Luna Morales

B. Universidad Autónoma de Puebla.

“Nuevos moduladores del desarrollo celular en los ovarios de los mamíferos”

11:30-12:30

Dr. José Luis Rosales

CINVESTAV, Zacatenco.

“Proteína tirosina fosfatasa de Entamoeba histolytica”

12:30-13:30

Dra. Ruth Jaimez Melgoza

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM.

“Estrógenos de uso clínico”

15:00-16:00

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

“Transducción de señales mediada por cinasas de la familia SnRK”

16:00-17:00

Dr. Víctor Valdés

Facultad de Ciencias, UNAM.

“Apuntes sobre genómica”

XL TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna “Jacinto Pallares”, Facultad de Derecho, UNAM
29, 30 y 31 de julio de 2013

Comité Organizador

Jorge Guevara Fonseca

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
guevarafa@yahoo.com.mx

Alberto Guevara Flores

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

Erika Patricia Rendón Huerta

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

Armando Butanda Ochoa

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
abutanda11@hotmail.com

Deyamira Matuz Mares

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

Héctor Vázquez Meza

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

Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVII**, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 1 – 16, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

La ruta de un Bioquímico Mexicano Homenaje *in memoriam* al Dr. Guillermo Mendoza Hernández

Marco Antonio Juárez Oropeza

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

El Dr. Guillermo Mendoza Hernández (1955-2012) inició su formación como investigador en el laboratorio del Dr. Juan C. Díaz Zagoya, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM en mayo de 1980, a los 25 años de edad, cuando motivado por contribuir al conocimiento de la Medicina se inscribió en los cursos Propedéuticos de la Maestría en Ciencias Biomédicas (área de Biología Molecular), así se llamaba el programa de posgrado de la Facultad de Medicina en esa época. Su formación profesional como Médico, concluida a los 24 años, le proporcionó el sustrato para alimentar su desarrollo como investigador, solamente faltaban los catalizadores: el posgrado y la docencia.

Su tesis de Maestría "17 beta estradiol deshidrogenasa de placenta humana: Purificación y propiedades", con la que se graduó a los 30 años, así como la tesis de Doctorado "Aspectos cinéticos y estructurales de dos 17 beta hidroxisteroide

deshidrogenasas de origen animal" con la que se graduó a los 34 años, reflejan su habilidad por las técnicas de separación de proteínas y por la caracterización de las enzimas, ambos temas involucran la esteroidogénesis por lo cual su trabajo lo realizó bajo la asesoría del Dr. Juan C. Díaz Zagoya. Como consecuencia de su preparación académica, de su constancia y de su trabajo experimental conspicuo, en ambos exámenes fue aprobado con Mención Honorífica y posteriormente recibió la medalla Gabino Barreda por su excelente participación en el Doctorado.

Su carrera docente la inició en octubre de 1980 con el nombramiento de Profesor de Asignatura "A" y posteriormente, en 1986, de Asignatura "B". A los 31 años de edad (1986), ya como Maestro en Ciencias, gana el concurso de oposición abierto como Profesor Asociado "B", se promueve a Profesor Asociado "C" a los 34 años, ya como Doctor en Ciencias. A los 37 años es Profesor Titular "A", a los 41 es Titular "B" y finalmente, a los 45 años, alcanza la máxima categoría, la de Profesor de Carrera Titular "C".

Desde 1980 impartió durante 32 años la asignatura de Bioquímica en la licenciatura de Médico Cirujano, en la misma Facultad que lo formó y que lo cobijó como investigador. También colaboró en los cursos "pre-médicos" y en "Asesorías de Bioquímica" entre 1980-1988.

Pocos alumnos tuvieron el privilegio de verse dirigidos por el Dr. Mendoza Hernández. Fue director de tesis de licenciatura de la Q.F.B. Elizabeth García Plascencia en 1990 y del Biólogo Fernando Minauro Sanmiguel en 1997, éste último continúa en labores de investigación. En Maestría en Ciencias Biomédicas graduó a Irma López Solache en 1990 (hasta 2002 se tiene el último registro de sus publicaciones científicas) y en Ciencias Bioquímicas a Fernando Minauro Sanmiguel (2000). En el doctorado en Ciencias Biomédicas graduó a Guadalupe Ayala Aguilar en 1994, quien continúa en labores de investigación.

El Dr. Mendoza Hernández fue merecedor de diversas distinciones académicas a lo largo de vida, fue Socio Numerario de la Sociedad Mexicana de

Bioquímica desde 1986, recibió la medalla Gabino Barreda en 1990, fue miembro del SNI como candidato a investigador (1985-1988), Nivel I (1989-2005) y Nivel II (2006-2012); recibió en 1999 mención honorífica en el premio CANIFARMA y, por su elevada productividad académica, fue distinguido en la UNAM con el máximo nivel del Programa de Primas al Desempeño "PRIDE" del personal Académico de Tiempo Completo en 2008, categoría "D". Sus publicaciones están registradas en los sitios web de BiomedExperts (http://www.biomedexperts.com/Profile.bme/928474/Guillermo_Mendoza-Hernández) y en el de Microsoft Academic Search (<http://www.journalogy.net/Author/11602707/quillermo-mendoza-hernandez>), además de encontrarse en los portales usuales de la comunidad científica, como PubMed, ISI Web of Knowledge, Science Direct y Scopus.

De las 100 publicaciones registradas en PubMed bajo la autoría o coautoría del Dr. Mendoza Hernández, desde 1984 hasta el 25 de mayo de 2013 (29 años, 3.5 artículos por año aproximadamente), la mayor cantidad de ellos ocurrió en el 2011 y el 2012 (13 y 17, respectivamente). Agrupados por décadas podemos resumir las 100 publicaciones en la siguiente distribución, de acuerdo con su fecha de ingreso a la UNAM (1980): 6 en 1980-1989, 12 en 1990-1999, 42 en 2000-2009 y 40 en los últimos 4 años de 2010 a 2013. No obstante, a partir de su primera publicación (1984) la distribución es la siguiente: 10 en 1984-1993, 23 en 1994-2003, 67 en 2004-2013. La última distribución nos muestra una productividad creciente en forma exponencial, 1 artículo por año en la primera década, 2.3 artículos por año en la segunda década y 6.7 artículos por año en la última década. Sin embargo, al utilizar la primera distribución podríamos especular que si fueron 6 artículos en la primera década, 12 en la segunda y 42 en la tercera, en la cuarta podrían haber sido 100 publicaciones, puesto que fueron 40 artículos en tan solo 4 años.

Las áreas en las que publicó el Dr. Mendoza Hernández pueden ser clasificadas de diferentes maneras, las que corresponden con sus líneas de investigación, que fueron: "Química y estructura de proteínas" y "Estudio del proteoma en diferentes modelos por espectrometría de masas y/o secuencia amino-

terminal”. A manera de ejemplo, en la Tabla 1 se presenta la distribución de los artículos por áreas del conocimiento, tomando como referencia los criterios de Scopus.

Tabla 1. Distribución de las publicaciones por áreas del conocimiento

ÁREA DEL CONOCIMIENTO	No. de Publicaciones
Bioquímica, Genética y Biología Molecular	72
Inmunología y Microbiología	31
Medicina	15
Ciencias Biológicas y Agricultura	13
Química	2
Física y Astronomía	2
Veterinaria	2
Farmacología, Toxicología y Farmacéutica	2
Ciencia Ambiental	1

Se clasificaron las 100 publicaciones en las que participó el Dr. Guillermo Mendoza Hernández, periodo 1984-2013.

Como se puede apreciar en la Tabla 1, las áreas propuestas no son suficientes, ni excluyentes. Debido a que los límites entre ellas son difíciles de delimitar, el tema de un artículo puede englobarse en dos o más áreas. No obstante, queda claro que la mayoría de las publicaciones pertenecen a dos áreas, la de “Bioquímica, Genética y Biología Molecular”, así como la de “Inmunología y Microbiología”.

De las 100 publicaciones registradas, se puede apreciar en la Tabla 2 que la mayoría correspondió a artículos de investigación.

Tabla 2. Tipo de documentos publicados por el Dr. Mendoza Hernández

TIPO DE DOCUMENTO	No. de documentos
Artículo	96
Erratum	1
Artículo en Prensa	1
Revisión	1
Carta	1

La colaboración del Dr. Mendoza Hernández con diversos grupos de investigación fue intensa y fructífera, los investigadores participantes se localizaron en el Continente Americano y en la Unión Europea (Tabla 3).

Tabla 3. Países de los autores con los que colaboró el Dr. Mendoza Hernández

PAÍS	No. de publicaciones
México	100
Estados Unidos	9
Francia	4
Alemania	4
Brasil	2
Colombia	2
Uruguay	1
Reino Unido	1
Cuba	1
Venezuela	1

De los 156 autores con los que publicó, varios de ellos colaboraron en diferentes artículos como se puede ver en las Tablas 4 y 5. El promedio de coautores por artículo es de 6, con un mínimo de 2 y un máximo de 16 coautores.

Tabla 4. Autores con los que publicó el Dr. Mendoza Hernández, de 3 a 18 veces

18	7	6	5	4	3	3
Rendón JL.	Pardo JP.	Zenteno E.	Plancarte A.	Diaz-Zagoya JC.	Agundis C.	Perez-Montfort R.
		Calcagno M.		Dominguez-Ramirez L.	Atteia, A.	Reyes-Vivas H.
				Flores-Herrera O.	De Leon-Rodriguez A.	Rodriguez-Sanoja R.
				Gomez-Puyou A.	Del Arenal IP.	Rodriguez-Zavala JS.
				Guevara-Flores A.	Garcia-Trejo J.J.	Rojo-Dominguez A.
				Lopez-Vidal Y.	Gonzalez-Halphen D.	Sanchez S.
				Robles-Flores M.	Gonzalez-Maquez H.	Van Lis R.
					Lopez-Casillas F.	Vilchis-Landeros MM.
					Mendoza V.	Zarco-Zavala M.
					Moreno-Sanchez R.	

De la inspección de las tablas 4 y 5 se destaca que la inmensa mayoría (125) colaboraron solamente en 1 artículo (79 autores) o en 2 publicaciones (46 autores). De los 31 investigadores restantes, 19 participaron en 3 publicaciones, 7 en 4 artículos, 1 en 5 trabajos, 2 en 6 artículos, 1 en 7 y 1 en 18 publicaciones. De estos 31 investigadores 11 pertenecen al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, lo que indica una fuerte colaboración entre los investigadores del mismo Departamento.

Tabla 5. Autores con los que publicó el Dr. Mendoza Hernández, de 1 a 2 veces

2	2	1	1
Aguirre C.	Perez-Gomez B.	Celis H.	Encalada R.
Altamirano MM.	Rendon-Huerta E.	Carvajal-Gamez Bl.	Esparza-Perusquia M.
Alvarez-Sanchez ME.	Rodriguez-Alvarez M.	Castaneda O.	Espinosa N.
Ayala G.	Rodriguez-Romero A.	Castaneda-Bueno M.	Espitia C.
Barba de la Rosa AP.	Romo S.	Castaneda-Patlan C.	Estrada-Parra S.
Barrera-Pacheco A.	Torres-Larios A.	Castillo-Villanueva A.	Fafutis-Morris M.
Betancourt M.		Cazares-Raga FE.	Farfan-Morales JE.
Blanco-Labra A.		Ceja V.	Farres A.
Cabrera N.		Carrero JC.	Fernandez P.
Contreras-Zentella M.		Cevallos MA.	Fischer H.
Costas M.		Chavez A.	Flisser A.
Encarnacion S.		Chavez FR.	Flores V.
Enriquez-Flores S.		Chavez-Pacheco, JL.	Flores-Luna L.
Escamilla JE.		Chihu-Amparan L.	Fonseca-Sanchez M.A.
Eslava C.		Cisneros D.A.	Forero A.
Estrada-Garcia I.		Comini M.	Galvez-Romero G.
Fernandez-Velasco D.A.		Contreras RG.	Garcia LM.
Ferreira FM.		Carrillo-Nava E.	Garcia W.
Fierro R.		Cravioto A.	Garcia-Cano I.
Fuentes-Silva D.		Cruz-Cordova A.	Garcia-Delgado N.
Gomez-Lojero C.		Cruz-Soto M.	Garcia-Gasca T.
Gonzalez-Aguilar H.		Cruz-Torres V.	Garcia-Huante Y.
Gutierrez-Cirlos EB.		Cuevas SR.	Garcia-Munoz A.
Hernandez-Alcantara G.		De Gomez-Puyou MT.	Garcia-Villegas R.
Hernandez-Arana A.		De La Rosa APB.	Garcia-Zepeda E.A.
Jimenez I.		De La Rosa-Morales F.	Garfias Y.
Juarez O.		De Leon SP.	Garza-Ramos G.
Landa A.		De Los Rios Castillo D.	Gomez-Concha C.
Libreros-Minotta CA.		De la Mora-De la Mora I.	Gomez-Manzo S.
Lopez-Solache I.		Delboni LF.	Gonzalez A.
Lopez-Velazquez G.		Delgado-Vargas F.	Gonzalez R.
Martinez F.		Depardon-Benitez F.	Gonzalez Y.
Membrillo-Hernandez J.		Diaz A.	Gonzalez-Mariscal L.
Minauro F.		Diaz-Camacho SP.	Gonzalez-Noriega A.
Montiel JL.		Diaz-Garcia CM.	Gonzalez-Pedrajo B.
Morales-Rios E.		Diaz-Sanchez V.	Gonzalez-Robles A.
Nava G.		Dinkova TD.	Groth G.
Oliva G.		Dixon HBF.	Guarneros G.
Olvera-Sanchez S.		Dominguez-Perez D.	Guerra-Sanchez G.
Pereyra A.		Dreyfus G.	

Por otro lado, del análisis de las 100 publicaciones mencionadas, el Dr. Mendoza Hernández colaboró en trabajos donde participaron 89 instituciones, 27

extranjeras y 62 nacionales. Como se detalla en las tablas 6 y 7, tanto en las instituciones extranjeras como en las nacionales se encuentran Universidades, Hospitales y Centros de Investigación.

La participación de las Instituciones extranjeras fue de una a dos veces (Tabla 6). En contraste, las Instituciones Nacionales (Tabla 7) participaron en un mínimo de 1 vez y un máximo de 17 veces. El Dr. Mendoza Hernández colaboró con 10 Universidades Estatales, entre ellas las de Puebla, Querétaro, Sinaloa, San Luis Potosí, Hidalgo, Morelos, Colima, Guadalajara, Veracruz y Durango. En el Distrito Federal colaboró con el CINVESTAV-IPN (en diversos campus), la Universidad Metropolitana-Iztapalapa, la Universidad de la Ciudad de México y la Universidad de la República.

En la Universidad Nacional Autónoma de México, colaboró con los Institutos de Fisiología Celular, de Química, de Neurobiología, de Investigaciones Biomédicas, y de Biología, así como con las Facultades de Química, de Estudios Superiores-Iztacala.

Tabla 6. Instituciones extranjeras

Acuario Nacional de Cuba	1	Universidad Estadual de Campinas	1
Brookhaven National Laboratory	1	Universidade de Sao Paulo	2
Helmholtz Centre for Infection Research HZI	1	Université des Sciences et Technologies de Lille	1
Heinrich Heine Universität	2	Universität Heidelberg	1
Institut Pasteur, Paris	2	Universite Joseph Fourier	1
IBSM Institut de Biologie Structurale et Microbiologie	1	University of Cambridge	1
Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH	1	University of Illinois at Chicago	1
Medical Research Council	1	University of Missouri-Columbia	1
Purdue University	1	University of Texas Health Science Center at San Antonio	1
Universidad Central de Las Villas	1	University of Texas System	1
Universidad de La Habana	1	Westfälische Wilhelms-Universität Münster	1
Universidad de Sucre No. 5-267	1	Yale University	1
Universidad Del Zulia Facultad Experimental de Ciencias	1	Rensselaer Polytechnic Institute	1
		Scripps Research Institute	1

En el sector salud, colaboró con los Hospitales Juárez de México, General de México, Dr. Gea González, Dr. Federico Gómez, IMSS-siglo XXI, con los Institutos Nacionales de Medicina Genómica, de Cancerología, de Cardiología, de la Nutrición, de Enfermedades Respiratorias, de Pediatría, de Salud Pública y con el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

Tabla 7. Instituciones Nacionales

Biológicos Y Reactivos de México BIRMEX	1	Instituto Nacional de Medicina Genómica	1
Laboratorios Roche	1	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla	1
PROBIOMED	1	Universidad Autónoma de la Ciudad de México	2
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN	8	Universidad Autónoma de Querétaro	2
Centro de Investigación y de Estudio Avanzados, Campus Guanajuato	1	Universidad Autónoma de San Luis Potosí	1
Centro de Investigaciones Multidisciplinarias UNAM-UABJO	1	Universidad Autónoma de Sinaloa	1
Centro de Investigaciones Químicas	1	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo	1
Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta	1	Universidad Autónoma del Estado de Morelos	1
Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria	1	Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa	7
Hospital General de México	2	Universidad de Colima, Facultad de Medicina	1 2
Hospital General Dr. Manuel Gea González	1	Universidad de Guadalajara	1
Hospital Infantil de México Federico Gómez	1	Universidad de la Republica	1
Hospital Juárez de México	1	Universidad Juárez del Estado de Durango	1
Fundación del Cáncer de mama-FUCAM	1	Universidad Nacional Autónoma de México	7 9
Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana	1	Centro de Neurobiología	1
Instituto Mexicano del Seguro Social	2	Facultad de Medicina	1 4
UMAE Hospital de Pediatría Centro Medico Nacional Siglo XXI	2	Div. de Estudios de Posgrado e Investigación	1
Instituto Nacional de Cancerología, México	2	Facultad de Química	1
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez	4	Instituto de Biología	1
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias	1	Instituto de Fisiología Celular de la UNAM	1 7
Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán	1	Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM	6
Instituto Nacional de Pediatría	6	Instituto de Química de la UNAM	2
Instituto Nacional de Salud Publica	1	Unidad de Biomedicina FES-Iztacala UNAM	1
Instituto Politécnico Nacional	4	Universidad Veracruzana	1
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica	3		

De las 56 revistas en las que se publicaron los artículos en los que participó el Dr. Mendoza Hernández (Tablas 8 y 9) 34 contienen de 2 a 5 artículos y en 22 revistas solamente publicó una sola vez. En tres de ellas: Parasitol Res, BBRC y Arch Biochem Biophys publicó 5 veces. Algunas revistas solamente se encuentran en formato electrónico, y otras ya han cambiado de nombre, pero todas tienen registro ISSN.

También colaboró con Instituciones particulares como la Fundación del Cáncer de mama, los laboratorios Roche, PROBIOMED, Biológicos y reactivos BIRMEX, entre otros.

Tabla 8. Revistas en que se encuentra de 2 a 5 publicaciones del Dr. Mendoza Hernández.

TÍTULO	No. Veces	TITULO	No. Veces
Parasitology Research	5	Photosynthesis Research	2
Biochemical and Biophysical Research Communications	5	Plant Physiology	2
Archives of Biochemistry and Biophysics	5	Protein and Peptide Letters	2
Biochemistry and Molecular Biology International	3	Proteome Science	2
Comparative Biochemistry and Physiology Section B Biochemistry and Molecular Biology	3	Biochemical Journal	2
FEBS Journal	3	Biochimica Et Biophysica Acta Bioenergetics	2
Biochemistry	3	Applied Microbiology and Biotechnology	2
Journal of Molecular Biology	3	Archives of Microbiology	2
Biochemical Journal	2	Biochimica Et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology	2
Biochimica Et Biophysica Acta Bioenergetics	2	Journal of Biological Chemistry	2
Applied Microbiology and Biotechnology	2	Journal of Applied Microbiology	2
Archives of Microbiology	2	Plos One	2
Biochimica Et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology	2	Molecular and Biochemical Parasitology	2
Journal of Biological Chemistry	2	Photosynthesis Research	2
Journal of Applied Microbiology	2	Plant Physiology	2
Plos One	2	Protein and Peptide Letters	2
Molecular and Biochemical Parasitology	2	Proteome Science	2

El contenido de la mayor parte de las revistas se relaciona con la Química, Bioquímica, Biología Molecular, Genómica, Proteínas, Enzimas, Proteoma, Inmunología y Parasitología, lo que permite una adecuada difusión de los trabajos de investigación publicados. En estos trabajos, el Dr. Mendoza Hernández aparece 10 veces como primer autor.

Tabla 9. Revistas en las que se encuentra una sola publicación del Dr. Mendoza Hernández

FASEB Journal	1	Journal of Parasitology Research	1
Clinical and Vaccine Immunology	1	Journal of Proteome Research	1
Current Medicinal Chemistry	1	Journal of Proteomics	1
Current Microbiology	1	Life Sciences	1
Experimental Cell Research	1	Microbial Pathogenesis	1
Cancer Causes and Control	1	Archives of Andrology	1
FEBS Letters	1	BMC Genomics	1
FEMS Microbiology Letters	1	Parasitology	1
Fish and Shellfish Immunology	1	Biochemistry International	1
Folia Histochemica Et Cytobiologica	1	Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects	1
Genomics	1	Plant Biology	1
Experimental Parasitology	1	Plant Molecular Biology	1
Infection and Immunity	1	Biochimica Et Biophysica Acta Molecular Cell Research	1
International Journal of Oncology	1	Molecular Reproduction and Development	1
International Journal of Plant Sciences	1	Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography	1
Journal of Agricultural and Food Chemistry	1	Proteins Structure Function and Genetics	1
Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications	1	Canadian Journal of Microbiology	1
Journal of Bacteriology	1	Proteomics	1
Journal of Bioenergetics and Biomembranes	1	Systems Biology in Reproductive Medicine	1
Infection Genetics and Evolution	1	Tuberculosis	1
Journal of Food Science	1	Vaccine	1
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene	1	Veterinary Parasitology	1

Con relación al impacto de los trabajos en los que participó el Dr. Mendoza Hernández, una primera aproximación se obtiene al analizar el total de citas a sus trabajos, que hasta el 25 de mayo de 2013 fueron 763 veces por 695 documentos. La distribución por año y por artículo se puede observar en las Tablas 10 y 11, respectivamente.

Tabla 10. Distribución por año del total de documentos que citan a los trabajos en los que participó el Dr. Mendoza Hernández

Total de documentos registrados : 695	No. de documentos
AÑO	
2013	39
2012	83
2011	94
2010	70
2009	56
2008	55
2007	43
2006	48
2005	43
2004	46
2003	34
2002	39
2001	17
2000	10
1999	7
1998	1
1997	4
1996	6

De manera similar a lo que se observó con el número de publicaciones en las que colaboró el Dr. Mendoza Hernández, la cantidad de citas que recibió a sus trabajos tuvo un máximo en los años 2011 y 2012 (106 y 86, respectivamente, en 94 y 83 documentos). Tres trabajos, publicados en 2001, 2003 y 2007 acumularon el mayor número de citas (61, 69 y 45, respectivamente).

Tabla 11a. Distribución de citas por artículo y por año, de las publicaciones en las que participó el Dr. Mendoza Hernández.

						<2011	2011	2012	2013	subtot	>2013	total
Year	Document Title	Authors	Journal Title	Volume	Issue	528	106	86	42	234	0	762
2013	Erratum: (BBA 1817S (2012) (S27-S28))	Zarco-Zavala M., et al.	BBA - Bioenergetics	1827	1	0	0	0	0	0	0	0
2012	Flagella ... Monocytes.	Cruz-Cordova A., et al.	PLoS ONE	7	12	0	0	0	0	0	0	0
2012	The cytosol... oxidase.	Cruz-Torres V., et al.	BBA - Bioenergetics	1817	12	0	0	0	0	0	0	0
2012	Proteomic ... albendazole	Paz-Maldonado M.T., et al.	Infection, Genetics and Evolution			0	0	0	0	0	0	0
2012	Identification... binucleatum	Campista-Leon S., et al.	Am J Trop Med Hyg	87	5	0	0	0	0	0	0	0
2012	A functional ... histolytica	Uribe R, et al.	Parasitology	139	13	0	0	0	0	0	0	0
2012	Toxins ... secretion	Diaz-Garcia C.M., et al.	Curr Med Chem	19	31	0	0	0	0	0	0	0
2012	Overexpression ... agglutinin	Solorzano C., et al.	Folia Histochem Cytobiol	50	3	0	0	0	0	0	0	0
2012	A proteomic ... PCC 7601	Perez-Gomez B., et al.	Photosynt Res	114	1	0	0	0	0	0	0	0
2012	The orosomucoid 1 ... myxoma	Garcia-Munoz A., et al.	Proteome Sci	10	1	0	0	0	0	0	0	0
2012	Breast ... grade	Fonseca-Sanchez M.A., et al.	Int J Oncol	41	2	0	0	0	0	0	0	0
2012	The identification ... cells	Rodriguez-Hernandez E., et al.	Vet Parasitol	187	3-4	0	0	0	0	0	0	0
2012	The absence ... embryos	Lazaro-Mixteco P.E., et al.	J Proteom Res	11	6	0	0	0	1	1	0	1
2012	Proteomic ... fruit	Huerta-Ocampo J.A., et al.	J Proteom Res	75	7	0	0	1	2	3	0	3
2012	Comparative ... origins	Flores V., et al.	Genomics	99	4	0	0	0	0	0	0	0
2012	Translation ...vaginalis	Carvajal-Gamez B.I., et al.	Microbial Pathogenesis	52	3	0	0	1	0	1	0	1
2012	Analysis ... seeds	Aguirre C., Torres I., et al.	J Food Sci	77	1	0	0	0	0	0	0	0
2012	Identification ... end	Saint Martin A., et al.	FEBS J	279	1	0	0	0	0	0	0	0
2011	Genomic ... infection	Orduna P., et al.	BMC Genomics	12		0	0	2	0	2	0	2
2011	Response ... maydis	Salmeron-Santiago K.G., et al.	Arch Microbiol	193	10	0	0	0	0	0	0	0
2011	Association ... ulcer	Ayala G., et al.	Cancer Causes and Control	22	10	0	0	0	0	0	0	0
2011	Annexin ...glucuronidase	Ramirez-Mata A., et al..	Exp Cell Res	317	16	0	0	1	1	2	0	2
2011	Detection... ATCC 8042	Garcia-Cano I., et al.	J Appl Microbiol	111	3	0	0	0	0	0	0	0
2011	Anti...Galatheidae]	Galvez-Romero G., et al.	Fish Shellfish Immunol	31	3	0	0	0	0	0	0	0
2011	Atypical ... complex V	De Los Rios Castillo D., et al	J Biol Chem	286	27	0	0	3	1	4	0	4
2011	Cloning...enzyme	Nava G., et al.	Exp Parasitol	128	3	0	0	1	0	1	0	1
2011	Enoyl-coenzyme ... patients	Serafin-Lopez J., et al.	Clin Vaccine Immunol	18	7	0	0	0	0	0	0	0
2011	A ribosomal ... populations	Aguirre B., et al.	PLoS ONE	6	6	0	0	1	0	1	0	1
2011	Water ... hypochondriacus L.)	Huerta-Ocampo J.A., et al.	Plant Biol	13	3	0	1	4	2	7	0	7
2011	The euryhaline ... profile	Segal-Kischinevzky C., et al.	Curr Microbiol	62	3	0	0	0	1	1	0	1
2011	Interaction ... coelicolor	Chavez A., et al.	Appl Microbiol Biotechnol	89	3	0	0	2	1	3	0	3
2010	Interactions ...violaceus	Mendoza-Hernandez G., et al.	Photosynthesis Research	106	3	0	0	2	1	3	0	3

Sin autocitas son en total 534.

Tabla 11b. Distribución de citas por artículo y por año, de las publicaciones en las que participó el Dr. Mendoza Hernández.

						<2011	2011	2012	2013	subtotal	>2013	total
2010	Increased ... production	Rodriguez-Zavala J.S., et al.	J Appl Microbiol	109	6	0	2	2	0	4	0	4
2010	Mitochondrial ... (Cysticerci)	Rendn J.L., et al.	J Parasitol Res	2010		0	1	1	0	2	0	2
2010	Na +- ... shiloonii	Gonzalez Y., et al.	FEMS Microbiol Lett	312	2	0	0	2	0	2	0	2
2010	The extracellular ... phase	Meneses N., et al.	Proteome Sci	8		0	2	1	0	3	0	3
2010	The quinohaemoprotein ... properties	Chavez-Pacheco J.L., et al.	Arch Microbiol	192	9	0	0	0	0	0	0	0
2010	The secretome ... proteins	Rodriguez-Alvarez M., et al.	Vaccine	28	23	0	2	0	0	2	0	2
2010	Purification ... serum	Alpuche J., et al.	Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol	156	1	0	1	3	1	5	0	5
2010	A novel ... proteobacteria	Morales-Rios E., et al.	FASEB Journal	24	2	2	2	1	3	6	0	8
2009	Betaglycan ... receptor	Mendoza V., et al.	Biochemistry	48	49	2	7	2	0	9	0	11
2009	Proteomic ... stress	Huerta-Ocampo J.A.N., et al.	Int J Plant Sci	170	8	3	3	1	1	5	0	8
2009	Glucose ... activity	Rodriguez-Bustamante E., et al.	Appl Microbiol Biotechnol	84	3	0	1	0	0	1	0	1
2009	Purification ... cysticerci	Plancarte A., et al.	Parasitology Res	105	1	0	1	1	0	2	0	2
2009	Phenotypic ... level	Rodriguez-Alvarez M., et al.	Tuberculosis	89	2	3	3	1	1	5	0	8
2008	5â€²-p-Fluorosulfonyl ... cysticerci	Guevara-Flores A., et al.	Mol Biochem Parasitol	162	2	1	2	1	1	4	0	5
2008	Thermal ... unfolding	Tellez L.A., et al.	Biochemistry	47	44	1	0	0	0	0	0	1
2008	The succinate... enzyme	Garcia L.M., et al.	Can J Microbiol	54	6	2	0	0	0	0	0	2
2008	Posttranslational ... esters	Robles-Flores M., et al.	BBA - Mol Cell Res	1783	5	3	4	1	0	5	0	8
2008	Glucose ... properties	Rendon J.L., et al.	Parasitol Res	102	6	2	0	1	0	1	0	3
2008	Key ... brucei	Cabrera N., et al.	Biochemistry	47	11	1	3	0	0	3	0	4
2007	Identification ... tuberculosis	Xolaipa W., et al.	Proteomics	7	18	19	16	8	2	26	0	45
2007	Kinetic ... histolytica	Saavedra E., et al.	FEBS J	274	18	9	2	3	1	6	0	15
2007	Crystallization ... isoform II	Fuentes-Silva D., et al.	Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun	63	9	0	1	0	1	2	0	2
2007	Lectin ... T-lymphocytes	Castillo-Villanueva A., et al.	J Agr Food Chem	55	14	1	3	1	0	4	0	5
2007	New ... reinhardtii	Van Lis R., et al.	Plant Physiol	144	2	9	1	1	1	3	0	12
2007	Analysis ... aeruginosa	Martinez-Becerra F., et al.	BBRC	355	2	2	1	2	0	3	0	5
2007	Disulfide ... Activity	Reyes-Vivas H., et al.	J Mol Biol	365	3	7	3	1	0	4	0	11
2006	Phytochelatin ... gracilis	Mendoza-Cozatl D.G., et al.	FEBS J	273	24	9	3	3	1	7	0	16
2006	Carbohydrate ... residues	Jimenez I., et al.	Arch Androl	52	6	1	0	1	0	1	0	2
2006	Carbohydrate ... residues	Jimenez I.,	Syst Biol Reprod Med	52	6	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 11c. Distribución de citas por artículo y por año, de las publicaciones en las que participó el Dr. Mendoza Hernández.

						<2011	2011	2012	2013	subtotal	>2013	total
2006	Structural ... coli	Ferreira F.M., et al.	J Mol Biol	359	2	5	1	0	1	2	0	7
2005	Circular ... pellucida	Zayas-Perez H., et al.	Protein Pept Lett	12	3	2	0	0	0	0	0	2
2004	Interconversion ... complexes	Dominguez-Ramirez L., et al.	J Bioenerg Biomembr	36	6	3	0	0	0	0	0	3
2004	Characterization ... rosenbergii	Pereyra A., et al.	BBA - General Subjects	1673	3	4	1	2	0	3	0	7
2004	A novel Bostrichidae)	Aguirre C., et al.	Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol	138	1	9	1	2	1	4	0	13
2004	Purification... (cysticerci)	Rendon J.L., et al.	Mol Biochem Parasitol	133	1	17	8	5	1	14	0	31
2003	Bifunctional ... mitochondria	Atteia A., et al.	Plant Mol Biol	53	1-2	17	2	2	1	5	0	22
2003	Identification ... approach	Van Lis R., et al.	Plant Physiol	132	1	63	4	0	2	6	0	69
2002	Purification ... copurification	Gonzalez R., et al.	Parasitol Res	88	10	5	0	1	0	1	0	6
2002	Susceptibility ... monomer	Reyes-Vivas H., et al.	Proteins: Structure, Function and Genetics	48	3	8	2	0	0	2	0	10
2002	Characterization ... solium	Vibanco-Perez N., et al.	Parasitol Res	88	5	11	0	2	0	2	0	13
2002	p32 ... hepatocytes	Robles-Flores M., et al.	J Biol Chem	277	7	29	2	1	0	3	0	32
2001	Equilibrium ... complexes	Dominguez-Ramirez L., et al.	FEBS Lett	507	2	9	0	0	0	0	0	9
2001	Exocytosis ... oocytes	Munoz-Gotera R.J., et al.	Mol Reprod Develop	60	3	11	1	1	1	3	0	14
2001	Recombinant ... agent	Vilchis-Landeros M.M., et al.	Biochem J	355	1	45	7	8	1	16	0	61
2001	Unfolding ... maxima	Rendon J.L., et al.	Arch Biochem Biophys	387	2	4	0	0	0	0	0	4
2000	Equilibrium ... urea	Vazquez-Contreras E., et al.	Prot Pept Lett	7	1	24	2	1	0	3	0	27
2000	On the role ... coli	Lara-Gonzalez S., et al.	J Mol Biol	301	1	9	0	0	0	0	0	9
2000	Crystallization ... coli	Ferreira F.M., et al.	Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr	56	5	5	1	0	0	1	0	6
2000	Aggregation ... denaturation	Mendoza-Hernandez G., et al.	BBA – Prot Struct Mol Enzymol	1478	2	7	0	1	1	2	0	9
2000	Pet toxin ... disruption	Villaseca J.M., et al.	Infect Immun	68	10	35	4	1	1	6	0	41
1999	Characterization ... kinase C	Rendon-Huerta E., et al.	Biochem J	344	2	14	1	0	0	1	0	15
1999	Characterization ... subunit	Plancarte A., et al.	Parasitol Res	85	8-9	17	1	2	0	3	0	20
1999	Rapid ... aeruginosa	Velasco-Garcia R., et al.	J Bacteriol	181	4	32	1	0	4	5	0	37
1997	Thermal ... maxima	Rojo-Dominguez A., et al.	Biochem Mol Biol Int	42	3	2	1	0	0	1	0	3
1996	Detergent ... pancreas	Mendoza-Hernandez G., et al.	Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol	115	2	1	0	0	0	0	0	1

Tabla 11d. Distribución de citas por artículo y por año, de las publicaciones en las que participó el Dr. Mendoza Hernández.

						<2011	2011	2012	2013	subtotal	>2013	total
1996	Human ... denaturation	Mendoza-Hernandez G., et al.	BBA - Prot Struct Mol Enzymol	1297	2	4	0	0	0	0	0	4
1995	Human ... binding	Mendoza-Hernandez G., et al.	Biochem Mol Biol Int	36	3	1	0	0	0	0	0	1
1995	Denaturing ... hydrochloride	Rendon J.L., et al.	Arch Biochem Biophys	318	2	8	0	1	0	1	0	9
1993	Effect ...maxima	Rendon J.L., et al.	Biochem Mol Biol Int	31	4	2	0	0	0	0	0	2
1992	Purification ... rubrum	Libreiros-Minotta C.A., et al.	Arch Biochem Biophys	298	1	10	0	0	2	2	0	12
1990	¹⁷ 5-3 ¹² -hydroxysteroid ... pancreas	Mendoza-Hernandez G., et al.	Life Sci	47	5	5	0	0	0	0	0	5
1990	Stability ... detergents	Ayala G., et al.	Biochem Int	22	4	3	0	0	0	0	0	3
1989	Dimer-tetramer ... maxima	Rendon J.L., et al.	Arch Biochem Biophys	268	1	5	0	0	1	1	0	6
1988	¹⁷ 2-hydroxysteroid ... pancreas	Mendoza-Hernandez G., et al.	BBRC	152	1	7	0	0	1	1	0	8
1987	Periodate-oxidized ... dehydrogenase	Mendoza-Hernandez G., et al.	BBRC	146	2	1	0	0	0	0	0	1
1986	Purification ... maxima	Rendon J.L., et al.	Arch Biochem Biophys	248	1	9	0	0	1	1	0	10
1985	A single ... placenta	Mendoza-Hernandez G., et al.	BBRC	126	1	2	0	0	0	0	0	2
1984	Dehydroepiandrosterone ... placenta	Mendoza-Hernandez G., et al.	BBRC	119	1	6	1	0	0	1	0	7

En conjunto, se puede decir que el impacto del trabajo del Dr. Guillermo Mendoza Hernández se reflejó no solo en las citas a sus trabajos, sino en la formación de recursos humanos, la colaboración entre los diferentes grupos de investigadores, tanto propios del Departamento de Bioquímica, como los de la comunidad científica nacional e internacional. Desafortunadamente su legado se acompañó del deterioro en su salud, pero su disciplina en el trabajo lo siguió hasta el final ya que falleció al regresar a la UNAM después de una visita a su doctor.

***Descanse en paz, esta fue
 La ruta de un Bioquímico Mexicano,
 La de nuestro querido Memo***



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 17 – 40, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

LA NADH DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE SODIO: ESTUDIOS MECANÍSTICOS Y PAPEL FISIOLÓGICO

SODIUM-DEPENDENT NADH DEHYDROGENASE: MECHANISTIC STUDIES AND PHYSIOLOGICAL ROLE

Oscar Juárez ¹ y Blanca Barquera

Departamento de Biología, Centro de Biotecnología y Estudios Interdisciplinarios,
Instituto Politécnico de Rensselaer. 110 8th St., Troy NY. 12180

Email: juareo@rpi.edu, oscarxjuarez@gmail.com

¹A quien la correspondencia debe ser dirigida

Resumen

Los proyectos de secuenciación masiva de genomas han producido una cantidad enorme de información, con la cual se han podido entender una multiplicidad de procesos biológicos, dentro de los que destacan los mecanismos utilizados por las bacterias patógenas para llevar a cabo la infección. En particular, se ha demostrado que la gran mayoría de estas bacterias son capaces de llevar a cabo la formación de gradientes transmembranales de sodio, los cuales son utilizados para una gran variedad de funciones homeostáticas. En esta revisión se abordan los aspectos fisiológicos relacionados con los gradientes transmembranales de sodio y su

participación en los mecanismos de sobrevivencia e infección de bacterias patógenas. En particular se discuten las vías primordiales para la generación del gradiente de sodio y su papel en mecanismos de transporte. El papel de la NADH deshidrogenasa dependiente de sodio es discutido a profundidad, ya que es la enzima cuya presencia correlaciona mayormente con la infectividad de las células patogénicas.

Palabras clave:

Abstract

Massive genome sequencing has provided an information amount that is unparalleled in the history of science, which has been useful to understand a large number of biological processes, including the mechanisms used by pathogenic bacteria to infect. In particular, it has been shown that the vast majority of these bacteria are able to build a transmembrane sodium gradient, which is used to sustain a variety of homeostatic processes. In this review, the physiologic aspects related to the role of sodium gradients are discussed, as well as their participation in the survival and infection mechanisms of pathogenic bacteria. In particular, the main pathways for the generation of the sodium gradient are discussed in the context of the transport mechanisms. The role of the sodium dependent NADH dehydrogenase is discussed in detail, since the presence of this enzyme correlates closely with the infectivity in pathogenic cells.

Keywords:

1. Introducción

Una de las características fundamentales de todos los organismos vivos es su capacidad para formar un gradiente transmembranal de iones. En todos los casos caracterizados, el gradiente es uno de los productos intrínsecos del metabolismo intermediario y energético, y de hecho representa uno de los mecanismos que le confieren a la membrana su permeabilidad específica, puesto que es utilizado por algunos de los transportadores para impulsar la acumulación de nutrientes [1-3]. Además, el potencial transmembranal es utilizado para una gran variedad de procesos homeostáticos, incluyendo la síntesis quimiosmótica de ATP, por el complejo de la F₁-F₀ ATP sintetasa, la regulación osmótica y de pH, entre muchos otros. Las bacterias presentan diferentes bombas de protones, las cuales son primordialmente las que se

encuentran en la cadena respiratoria. Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha demostrado que los genomas, de una gran variedad de bacterias patógenas, presentan una o varias bombas de sodio y varios sistemas de transporte acoplado a este ión, como son simportadores o antiportadores de sodio/ anión inorgánico o sodio/ anión orgánico [4].

La presencia de los transportadores primarios de sodio en organismos patógenos sugiere que los gradientes de sodio tienen papeles fisiológicos muy importantes. La mayoría de los organismos “de vida libre”, así como las mitocondrias en organismos eucariontes, utilizan los gradientes de protones como “moneda energética”. El gradiente de protones que es producido por la cadena respiratoria es la manera en la que la energía química, que se libera en varias reacciones redox, es transformada en energía potencial, que puede ser utilizada por la célula para realizar trabajo. Este mecanismo de transducción energética está ampliamente distribuido y se encuentra presente en la inmensa mayoría de las células, tanto eucariontes como procariontes. No obstante, el sistema acoplado a protones tiene ciertas limitaciones, las cuales de hecho son aprovechadas por el sistema de protección inmunológica de nuestro organismo. Una de las primeras barreras físicas ante las que los organismos patogénicos se enfrentan al colonizar el cuerpo es la composición misma de los líquidos corporales, en particular el pH, el cual es ligeramente básico ($\text{pH}_{\text{plasma}} 7.2-7.4$). Esto produce que las bacterias patógenas se enfrenten a un gradiente de protones “invertido” (con respecto a la mitocondria), en el que el pH externo es más básico con respecto al pH interno, por lo cual los protones no pueden ser utilizados para producir el gradiente [5, 6].

Esta es, sin duda, una de las razones por la que las bacterias patógenas utilizan gradientes de sodio como estrategia de sobrevivencia. Los gradientes de sodio son utilizados para una gran variedad de procesos, entre los que están: el transporte de nutrientes, como aminoácidos, ácidos tri y di carboxílicos, azúcares, y otros iones como aniones inorgánicos divalentes, tales como el sulfato y el fosfato, la síntesis de ATP, la

regulación osmótica y de pH [5, 7, 8]. El gradiente de sodio también es utilizado para impulsar la rotación del flagelo bacteriano, para la extrusión de antibióticos, primordialmente por el MDT (multidrug transporter) y para la producción de toxinas (Figura 1).

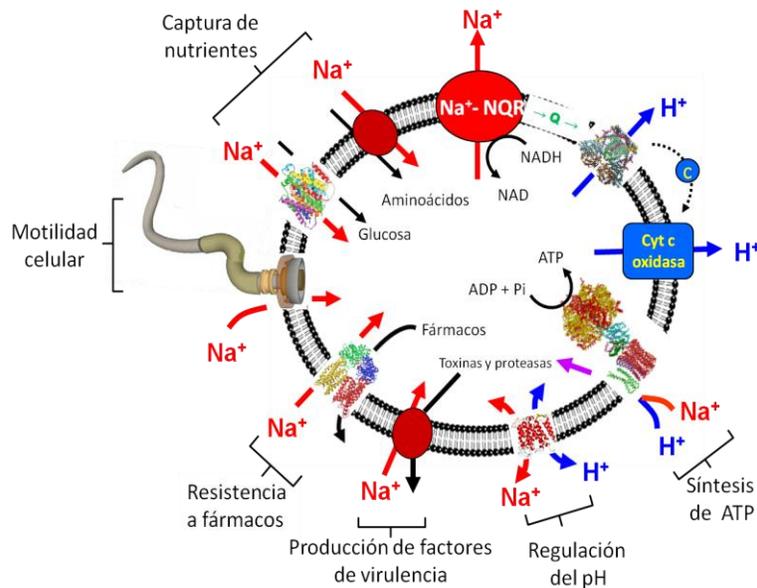


Figura 1. Mecanismos homeostáticos asociados con el gradiente de sodio. En el esquema se indica que Na^+ -NQR (así como una serie de bombas) son capaces de crear el gradiente de sodio, el cual es usado por simportadores de nutrientes, tales como el de Na^+ - aminoácidos, Na^+ -carbohidrato o Na^+ -fosfato. En el caso de parásitos intracelulares, como *Chlamydia trachomatis*, se ha reportado que el transporte de nucleótidos es dependiente de sodio. En algunas bacterias, como *Vibrio cholerae*, se ha demostrado que la rotación del flagelo también depende de sodio y que la expulsión de fármacos por la proteína transportadora de drogas múltiples (Multidrug Transport Protein) es impulsada por el gradiente, mediante un mecanismo de antiporte. Finalmente, existen algunos ejemplos de organismos patógenos que podrían llevar a cabo la síntesis de ATP dependiente del gradiente de sodio, mediante una ATPasa de tipo A.

Mecanismos de generación del gradiente de sodio en bacterias patógenas.

A pesar de que los mecanismos de bombeo de sodio en los procariontes son muy diversos (Figura 2), las bacterias patogénicas llevan a cabo este proceso primordialmente a través de dos bombas de sodio, la descarboxilasa membranal de ácidos dicarboxílicos y la NADH deshidrogenasa dependiente de sodio (Na⁺-NQR), y varios antiportadores Na⁺/H⁺ de la familia Nha [4, 9].

1.1 Descarboxilasa membranal de dicarboxilatos.

Estas enzimas emplean la energía liberada por la descarboxilación de ácidos dicarboxílicos para transportar sodio en contra de su gradiente de concentración. La reacción química que catalizan es la siguiente, la cual genera una cantidad considerable de energía libre:



Estas enzimas se clasifican de acuerdo a la reacción que catalizan: oxaloacetato a formato, malonato a acetato, succinato a propionato, glutarato a butirato e isobutirato, malato a lactato, metilmalonil -CoA a propanoil -CoA, entre otros. Las descarboxilasas presentan tres subunidades: α , β y γ , así como un ión de zinc y una molécula de biotina como cofactores. Las subunidades γ y α están involucradas en las reacciones de transferencia del carboxilo a la biotina y en la posterior descarboxilación de este cofactor, respectivamente. Por otro lado, la subunidad β está exclusivamente involucrada en el transporte de sodio [10]. Es importante mencionar que el metabolismo asociado a este enzima es estrictamente anaeróbico, por lo cual puede ser encontrado en bacterias del tracto digestivo, pero no es muy común en bacterias que sean capaces de colonizar el interior del cuerpo.

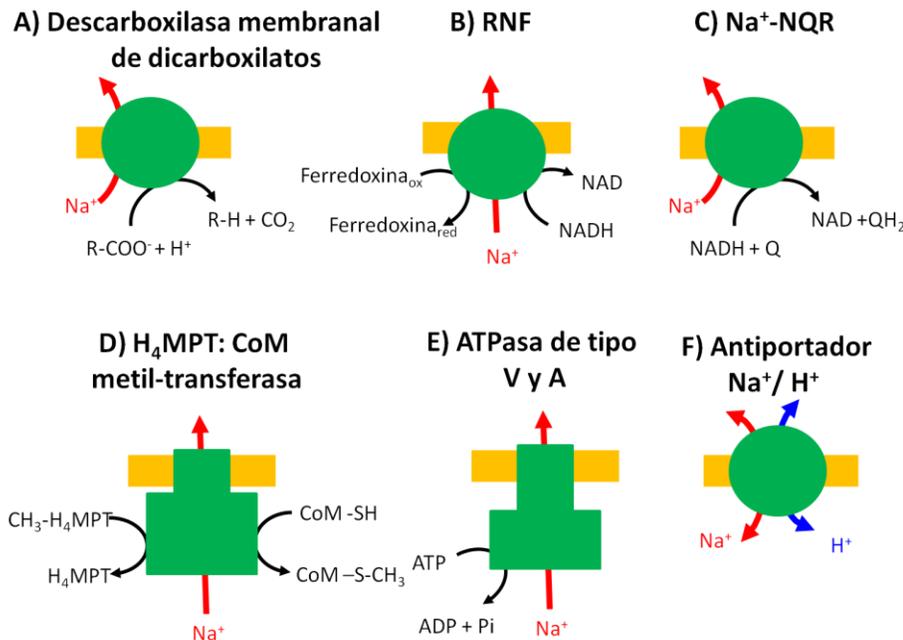


Figura 2. Transportadores primarios de sodio en arqueobacterias y bacterias. A) Descarboxilasa membranar de dicarboxilatos. B) RNF (Rhodobacter Nitrogen fixing protein), cataliza la transferencia de electrones del NADH a la ferredoxina y bombea sodio. Esta enzima es especialmente importante en la fijación del nitrógeno en *Rhodobacter capsulatus* [11] y en la fermentación del cafeato en *Acetobacterium woodii* [12]. Sin embargo, la función específica que realiza puede variar en estos dos organismos. C) NADH deshidrogenasa dependiente de sodio [13, 14]. D) MPT: CoM metil transferasa; este complejo membranar encontrado en arqueas cataliza la transferencia de grupos metilo de la tetrametanopterina a la coenzima M, con el consecuente bombeo de sodio [15]. E) Al igual que en muchos tipos de hongos y protistas, algunas bacterias son capaces de llevar a cabo el bombeo de sodio mediante las ATPasas de la familia V o A, las cuales usan la ruptura del enlace γ de alta energía del ATP para bombear sodio. F) El antiportador Na^+/H^+ es un transportador ampliamente distribuido que lleva a cabo la formación del gradiente de sodio a expensas del gradiente de protones [16].

1.2 Antiportadores Na^+/H^+

Los antiportadores Na^+/H^+ se encuentran ampliamente distribuidos en eubacterias, arqueas y eucariontes. Son proteínas politópicas de una sola subunidad, con un peso de aproximadamente 60 kDa. Tienen un papel esencial, tanto en la regulación del pH interno, como en la protección osmótica de las células. La función que realizan es la conversión de la energía potencial del gradiente de protones en

energía potencial hacia el gradiente de sodio y viceversa, puesto que son capaces de intercambiar Na^+ por H^+ , en la relación que varía dependiendo del tipo de antiportador, de 2:3 a 1:2 [17, 18]. A pesar de estar ampliamente distribuidas, su papel podría ser secundario, puesto que al ser transportadores secundarios dependen del gradiente de protones, el cual, como se mencionó anteriormente, podría tener un papel limitado.

1.3 NADH deshidrogenasa dependiente de Na^+

A pesar de la gran variedad de transportadores de sodio que se encuentran en bacterias patógenas, la NADH deshidrogenasa dependiente de sodio o Na^+ -NADH:quinona reductasa (Na^+ -NQR) es la enzima que está más estrechamente asociado con la patogenicidad [4, 19]. En la tabla I se muestran algunos ejemplos de organismos patógenos que presentan a la Na^+ -NQR. También muestra la distribución de otros transportadores de sodio, como la descarboxilasa de dicarboxilatos, el antiportador Na^+/H^+ (Nha), así como algunos simportadores o antiportadores cuya actividad depende del gradiente de sodio. La tabla también muestra la presencia de bombas de protones, las cuales son principalmente las que se encuentran en la cadena respiratoria. Como se puede observar, Na^+ -NQR se encuentra presente en una gran variedad de bacterias patógenas que no están relacionadas entre sí, como son proteobacterias, bacteroides y clamidias, lo cual indica que ha habido varios procesos de transferencia horizontal de genes involucrados en su distribución actual, pero también indica que esta enzima tiene un papel importante en los mecanismos de patogenicidad. De hecho, su papel debe ser especialmente importante en bacterias como *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *H. influenzae*, puesto que no presentan ninguna otra bomba primaria de sodio.

Patógeno bacteriano	Bombas de Na ⁺		Bombas de H ⁺		Transportadores secundarios	
	Na ⁺ -NQR	DicDec	Complejo I	Vías de citocromos	Nha	Transportadores acoplados a Na ⁺
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Si	No	No	Si	No	Ala, AA ramificados, Dic, Glu, Gly, Pro, Pi, Ser, Tyr,
<i>Chlamydiophyla pneumoniae</i>	Si	No	No	Si	No	Ala, Branched AA, Dic Glu, Gly, Pro, Pi, Ser, Tyr
<i>Haemophilus influenzae</i>	Si	No	No	Si	Si	Ala, Glu, Pro, Ser, Drugs
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Si	Si	Si	Si	Si	Ala, Glu, Pro, Ser, Pi, Citrate, Drugs
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Si	No	Si	Si	Si	Ala, Glu, Pro, Ser
<i>Pasteurella multocida</i>	Si	Si	No	Si	Si	Ala, Pro, Drugs
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Si	Si	No	Si	Si	Pro
<i>Prevotella melaninogenica</i>	Si	Si	No	Si	Si	Ala, Glu, Pro, Ser
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Si	Si	Si	Si	Si	Ala, Glu, Pro, Ser, Pi, Drugs
<i>Salmonella enterica</i>	Si	Si	Si	Si	Si	Ala, Glu, Pro, Ser, Pi, citrate
<i>Vibrio cholerae</i>	Si	Si	No	Si	Si	Ala, Glu, Pro, Ser, Pi, citrate, drug
<i>Yersinia pestis</i>	Si	No	Si	Si	Si	Glu, Pro, Ser, Drug

Tabla I. Distribución de los sistemas de transporte primario de sodio y protones en bacterias patógenas. Na⁺-NQR; NADH deshidrogenasa dependiente de sodio, DicDec; Dicarboxylato descarboxilasa, Complejo I; NADH deshidrogenasa dependiente de protones, Nha; antiportador de sodio /proton, Dic; Dicarboxilatos, Pi; fosfato. Los aminoácidos se indican en códigos de tres letras. Las vías de citocromos están compuestas por oxidasas terminales, tales como las oxidasas de quinol (citocromo *bd* oxidasa), o por quinol: citocromo *c* oxidoreductasa (*bc1*) y citocromo *c* oxidasas (citocromo *cbb*, *aa3*). Los datos de esta tabla fueron tomados de la referencia [4].

La Na⁺-NQR cataliza la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona, usando la energía liberada por la reacción redox para bombear sodio [13]. Existen otras dos familias de enzimas que realizan esta misma función redox, como son las NDH-1 y NDH-2 (Figura 3) [20,21]. En el grupo de la familia NDH-1 se encuentran los enzimas relacionadas al complejo I mitocondrial, los cuales funcionan como bombas de protones. Esta familia tiene un núcleo de 13 subunidades, aunque en muchos casos se

encuentran un número variable de subunidades supernumerarias, las cuales pueden ser más de 30 en mamíferos [20]. Los cofactores utilizados en la reacción redox son una molécula de FMN unida de manera no covalente y hasta 10 centros Fe-S. En el grupo NDH-2 se encuentran las NADH deshidrogenasas alternas, las cuales están compuestas por una sola subunidad de 30-60 kDa y presentan como cofactor a una molécula de FAD, unida por interacciones no covalentes.

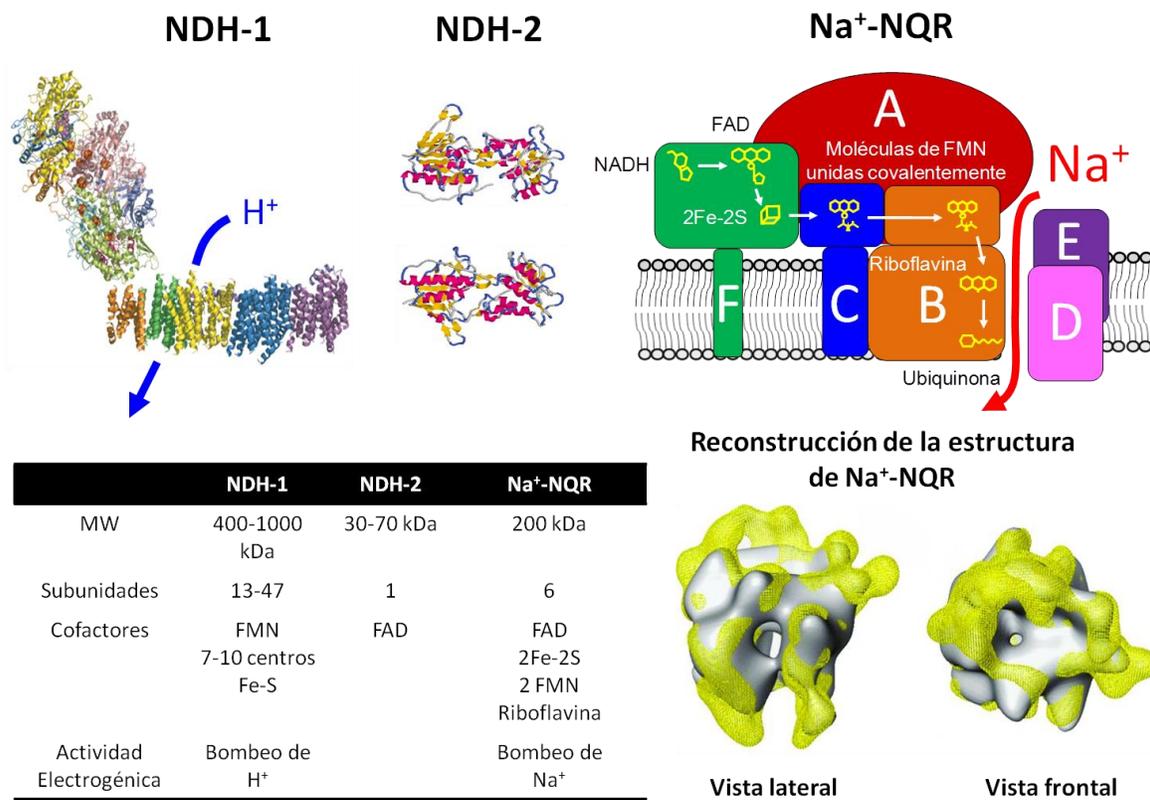


Figura 3. Representación de los tres tipos de NADH deshidrogenasas respiratorias, su composición de subunidades y cofactores, así como su participación en el bombeo de iones. En el panel de la derecha abajo se muestra una reconstrucción de la estructura tridimensional de Na⁺-NQR [22].

Una característica interesante de esta familia es que son el único tipo de NADH deshidrogenasas membranales que no bombean iones [21]. A pesar de no estar vinculadas directamente con la formación del potencial transmembranal, la familia de

NDH-2 es la más ampliamente distribuida y se encuentra en arqueobacterias, bacterias y en la mitocondria de los eucariontes, incluyendo la de algunos animales. Por otro lado, la familia de Na⁺-NQR tiene como característica distintiva que es la única enzima respiratoria capaz de bombear iones de sodio a través de la membrana plasmática [13, 14]. Los miembros de esta familia presentan seis subunidades y el complejo tiene un peso molecular de alrededor de 200 kDa. Su distribución es relativamente más restringida que los otros tipos de NADH deshidrogenasas, ya que está ausente en arqueobacterias y eucariontes, y como se mencionó se encuentra mayormente en ciertos linajes procariontes de bacterias patógenas, pero también se puede encontrar en bacterias halófilas y extremófilas, incluyendo proteobacterias no patogénicas y clorobios y planctomicetos

2.3.1 Estudios estructurales y mecanísticos de la Na⁺-NQR

2.3.1.1 Composición de subunidades, topología y motivos estructurales

Na⁺-NQR presenta seis subunidades y cinco cofactores (Figura 4): una molécula de FAD y una de riboflavina, unidas de manera no covalente, un centro de 2Fe-2S y dos moléculas de FMN unidas covalentemente [13]. La presencia de la riboflavina como cofactor en Na⁺-NQR ha resultado muy curioso, puesto que se había llegado a la generalización de que el papel de la riboflavina en el metabolismo celular era el de dar lugar a la formación de FMN y de FAD, los cuales son mucho más hidrofílicos y funcionan como cofactores en la mayoría de los flavoenzimas [23]. Sin embargo, estudios recientes de nuestro grupo muestran que la riboflavina es un cofactor genuino en Na⁺-NQR, el cual participa en la transferencia de electrones a la ubiquinona (ver adelante) [24, 25].

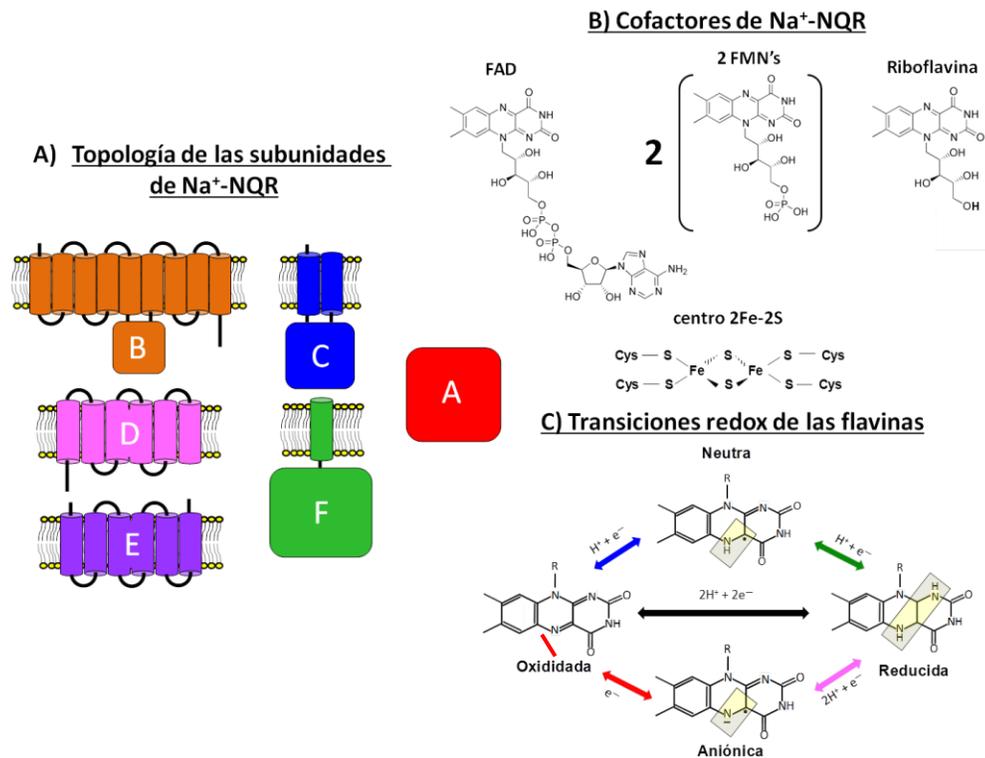


Figura 4. Composición y topología de subunidades (A) y cofactores (B) de Na⁺-NQR. También se muestran las cuatro transiciones redox principales de las flavinas (C). Las subunidades de Na⁺-NQR se denominan NqrA-F, las cuales en la mayoría de los organismos se encuentran codificadas en un operón, que produce un RNA mensajero policistrónico [26]. La subunidad A es una proteína hidrofílica de 50 kDa, con un plegamiento hipotético de tipo $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$. La estructura tridimensional se desconoce por completo, puesto que no se ha cristalizado y no hay homólogos caracterizados, ni cristalizados. NqrA no tiene cofactores conocidos [13, 14], aunque recientemente se propuso que una molécula de ubiquinona podría interactuar con ella [27]. Estudios sin publicar de nuestro grupo indican que tiene un papel importante en el ensamblaje de Na⁺-NQR, ya que la mutante que carece de esta subunidad es incapaz de producir el complejo.

La subunidad B es una proteína hidrofóbica con nueve hélices transmembrales y un asa intracelular que conecta a las hélices V y VI, de aproximadamente 50 residuos, donde se encuentra el motivo de unión a FMN [13, 26, 28]. Na⁺-NQR es una de las pocas proteínas que son capaces de unir covalentemente a la flavina. La unión de cofactor se lleva a cabo por un enlace de tipo fosfoéster entre la molécula de FMN y un residuo de la cadena polipeptídica con un grupo alcohol, en particular el residuo de

treonina que se encuentra en el carboxilo terminal del motivo conservado: (D/Q)-X1-6-D-X2-(S/T)(G/M)AI [26, 29]. Este tipo de enlace también es poco común y solo se encuentra en enzimas que pertenecen a la familia donde se encuentran NqrB, RnfD (homólogo de NqrB en el enzima RNF), la proteína reguladora de la expresión de la NO₂ reductasa (NOsR), la proteína reguladora NirI y otras proteínas membranales poco caracterizadas. Otra característica interesante de esta subunidad es que presenta zonas hidrofílicas en las hélices transmembranales, en particular destacan residuos ácidos de aspartato y glutamato en las hélices 1, 3, 5, 6 y 8, y dos más en la hélice 9, los cuales están perfectamente conservados en la familia. Los estudios realizados en nuestro laboratorio indican que de la mayoría de esos residuos juegan un papel importante, ya sea en la unión o transporte de sodio (ver más adelante) [30]. También se han encontrado cerca de diez residuos polares sin carga en diversas regiones transmembranales de esta subunidad. Sin embargo, solo dos están conservados, por lo que en general su papel puede ser pequeño, aunque como señalamos recientemente, podrían tener un papel estructural, estabilizando las interacciones de las hélices transmembranales.

La subunidad C presenta 2 cruces transmembranales y un dominio intracelular de 200 residuos, donde se encuentra el sitio de unión covalente de la segunda molécula de FMN [26, 29]. Este sitio presenta un arreglo similar al encontrado en el sitio de unión del FMN en la subunidad B, pero curiosamente estas dos proteínas no están emparentadas. Recientemente se pudo resolver la estructura cristalográfica de esta proteína (PDB 3LWX), sin embargo, el cristal se obtuvo con la apoenzima (proteína sin FMN), por lo cual mas estudios serán necesarios para esclarecer su papel en el ciclo catalítico.

La subunidades D y E son proteínas altamente hidrofóbicas con 6 cruces transmembranales, las cuales presentan 6 y 5 residuos negativos, respectivamente, que al igual que en el caso de la subunidad B están conservados en la familia de Na⁺-NQR [30]. Estas dos subunidades forman un grupo estrechamente relacionado y los

análisis filogenéticos muestran que aparentemente se originaron a partir de la duplicación de un gen ancestral. La subunidad B también presenta similitud con este grupo, aunque es sustancialmente menor. Sin embargo, es plausible que el núcleo central de Na⁺-NQR, compuesto por las tres subunidades más hidrofóbicas (B, D y E), haya evolucionado de manera conjunta y en eventos posteriores se pudieron incorporar los demás componentes.

La subunidad F presenta un segmento transmembranal y un dominio hidrofílico de 380 residuos. El dominio soluble es homólogo a los miembros de la familia FNR (Ferredoxina Reductasa) y presenta un motivo conservado de cuatro cisteínas de tipo: C-X5-C-X2-C-X30-L(A/T)CQ, que es responsable de la unión del centro 2Fe-2S [31, 32]. Al igual que otros de los miembros de esta familia, la NqrF presenta motivos de unión de FAD y de NADH, con plegamientos de tipo Rossmann. La estructura cristalográfica ya está disponible (PDB 2R6H), y confirma previas propuestas con respecto a que el sitio de unión del FAD podría estar en un punto intermedio entre el NADH y el centro 2Fe-2S.

2.3.1.2 Propiedades redox de los cofactores.

Cuatro de los cinco cofactores del enzima son moléculas de flavina (FAD, riboflavina y FMN), las cuales presentan como centro redox un anillo de isoalloxazina unido a ribitol, un poli alcohol derivado de la reducción de la ribosa. Las flavinas funcionan como centros redox flexibles, capaces de realizar reacciones con uno o dos electrones [23, 33]. En el caso de las reacciones que involucran un electrón, se forman especies radicales y puesto que en la reacción redox está acompañada por protones, los radicales pueden ser de dos clases, neutros o aniónicos (Figura 4C). Los estudios llevados a cabo primordialmente por Barquera y cols [34] demostraron claramente que tres de las cuatro flavinas en la enzima son capaces de producir radicales estables. Estudios con mutantes que carecen de varios de los cofactores indican que las dos moléculas de FMN unidas de manera covalente a las subunidades B y C se pueden

reducir parcialmente con un electrón dando lugar a la formación de radicales aniónicos [34,35]. Curiosamente, el FMN que se encuentra en la subunidad B se puede reducir por completo (en dos pasos), mientras que el FMN en la subunidad C permanece en un estado aniónico intermediario aun bajo condiciones reductoras extremas [34, 36]. Por otro lado, la molécula de riboflavina se encuentra en el estado de radical neutro en condiciones oxidantes, el cual es muy estable. Por otro lado, el FAD es el único cofactor que no forma un radical estable, sin embargo, se ha demostrado que puede formar un radical neutro transitorio, el cual es importante para la transferencia de electrones a durante el ciclo catalítico [37] (ver a continuación). El centro 2Fe-2S, también es una especie de radical en su forma completamente reducida, la cual solo acepta un electrón [34, 35].

Recientemente estudiamos las propiedades termodinámicas de los cofactores (Figura 5A). Nuestros estudios demostraron que los centros redox se organizan de manera escalonada llevando paulatinamente a los electrones de alto potencial redox a estados más oxidantes [38]. Este esquema contrasta de manera importante con muchas bombas de protones, en las cuales una sola transición redox se lleva a cabo entre centros que difieren grandemente entre sus potenciales redox, provocando que esta reacción sea altamente energética y en muchos casos sea considerada como la reacción involucrada en el bombeo de iones [32,39]. Como se discutirá en las siguientes secciones, la reducción paulatina de los potenciales redox concuerda con un esquema en el cual el bombeo de sodio se lleva a cabo mediante cambios conformacionales. De manera interesante, la adición de sodio promueve un cambio de 90 mV en el potencial redox de FMN en la subunidad C, el cual tiene un papel importante en el bombeo iónico.

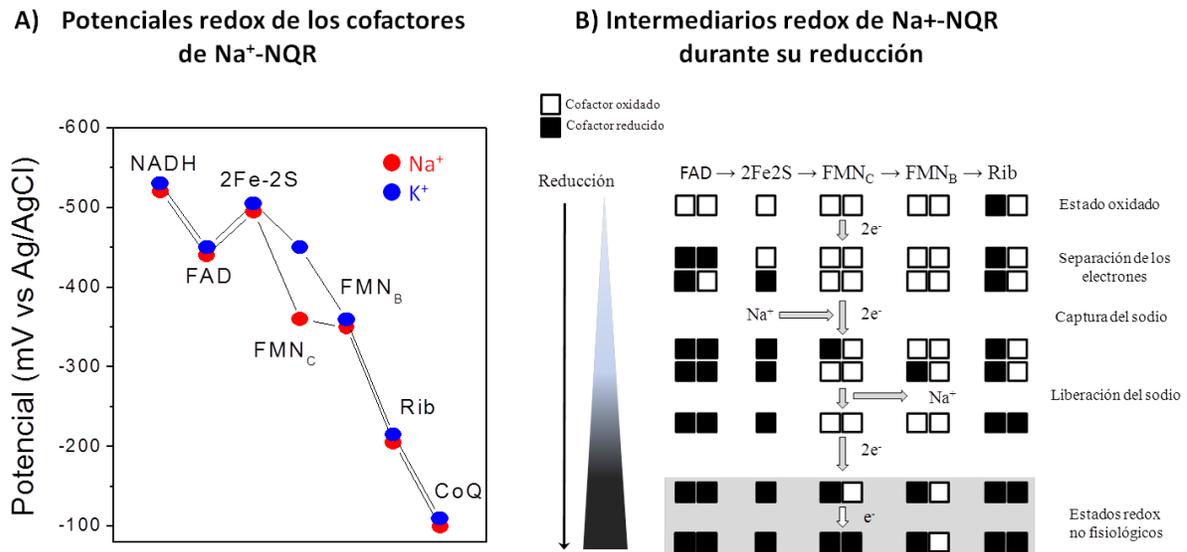


Figura 5. Potenciales redox de los cofactores de Na⁺-NQR (A) y estados redox encontrados durante la reducción del enzima (B). La figura 5A además muestra el efecto del sodio sobre el potencial redox sobre el potencial de FMN en la subunidad C.

2.3.1.3 Estructuras relacionadas con la unión y transporte de sodio.

Na⁺-NQR había sido considerada como una bomba de iones con exclusividad absoluta por sodio [40, 41]. Sin embargo, nosotros demostramos recientemente que la enzima también puede usar litio como sustrato, aunque con una velocidad apreciablemente menor [42]. De manera interesante, al realizar experimentos utilizando mezclas de sodio y litio demostramos que la enzima presenta al menos dos sitios de unión al catión, los cuales presentan cooperatividad cinética positiva, es decir, la unión del sodio o litio al primer sitio facilita la unión al segundo sitio. Titrulaciones de la enzima con ²²Na, demostraron que la enzima presenta hasta tres sitios diferentes de unión al sodio, corroborando la información obtenida en los estudios de cinética de estado estacionario [42]. Nuestras caracterizaciones además, demostraron que la enzima presenta un cuarto sitio de unión a cationes, que es regulado por potasio, el cual es un

activador. El rubidio también puede ocupar este sitio, pero de manera interesante, se comporta como un inhibidor.

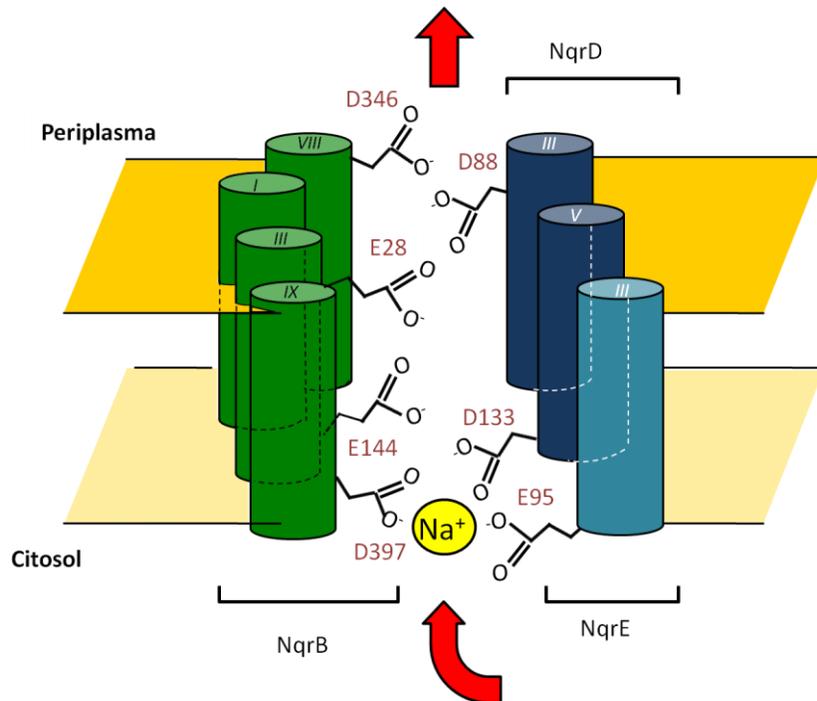


Figura 6. Modelo de trabajo de las estructuras y residuos ácidos involucrados en el transporte de sodio.

En nuestro grupo describimos que Na⁺-NQR presenta 17 residuos ácidos en las hélices transmembranales de las subunidades B, D y E. Como se menciona previamente, estos residuos están conservados en la familia, por lo que podrían participar en las estructuras involucradas en el transporte de sodio [30]. Estos residuos fueron cambiados, mediante mutagénesis, a residuos alifáticos, los cuales no tienen carga y las mutantes fueron caracterizadas. A pesar de que casi todas las mutantes tuvieron un efecto significativo en la actividad, siete de los residuos son especialmente importantes, ya que las mutantes modifican en más del 70% la actividad dependiente de sodio. Además, notamos que las propiedades de estas siete mutantes correlacionaban con la ubicación topológica de los diferentes residuos, por ejemplo, los residuos orientados hacia el citosol modificaban enormemente la afinidad por sodio,

indicando que podrían ser parte de uno o varios sitios de unión (Figura 6). Los residuos orientados hacia la cara extracelular de la proteína modificaban la actividad, pero no modificaban la afinidad por sodio, lo cual indica que la enzima es capaz de capturar al sodio, pero no de transportarlo, por lo que estos residuos podrían formar parte del o los canales por los que el sodio es liberado [30]. Hasta el momento nos encontramos caracterizando estos residuos, para aclarar el mecanismo por el cual los iones son bombeados por la enzima.

2.3.1.4 Mecanismo de transporte de electrones

En nuestro grupo pudimos discernir la vía por la cual se transportan internamente los electrones en Na⁺-NQR, mediante el uso de técnicas de cinética rápida, estudiando mutantes que no presentan varios de los cofactores. Nuestro modelo indica que los electrones viajan a través de la enzima siguiendo la ruta: FAD → 2Fe-2S → FMNC → FMNB → Riboflavina (Figura 7A). La evidencia que nos llevó a proponer este modelo se resume en los siguientes datos: 1) la mutante que carece de FAD es incapaz de aceptar electrones, por lo que este cofactor debe ser el aceptor inicial; 2) la mutante donde el centro 2Fe-2S se elimina, acepta dos electrones a nivel del FAD y no forma radicales estables, lo cual demuestra que este centro es el siguiente eslabón en la cadena y es congruente con el hecho de que el FAD es el único centro que no sufre reducciones parciales de un electrón; 3) en la mutante de FMN en la subunidad C se reducen tanto el FAD como el centro 2Fe-2S y en la mutante de FMN en la subunidad B se reducían el FAD, el centro 2Fe-2S, así como una molécula de FMN que aparece en forma de radical aniónico, lo cual demostraba que los centros FMNC y FMNB (en este orden) eran los siguientes aceptores de electrones; 4) el sitio de unión de la riboflavina no se ha caracterizado, por lo cual no se pudieron realizar estudios por mutagénesis sitio dirigida. Sin embargo, habíamos demostrado que el radical neutro, que corresponde a la riboflavina, es el único centro que acepta electrones del ubiquinol, el cual es uno de los productos de la reacción, lo cual demostraba que la riboflavina era el aceptor final de electrones en la enzima y el donador hacia la ubiquinona.

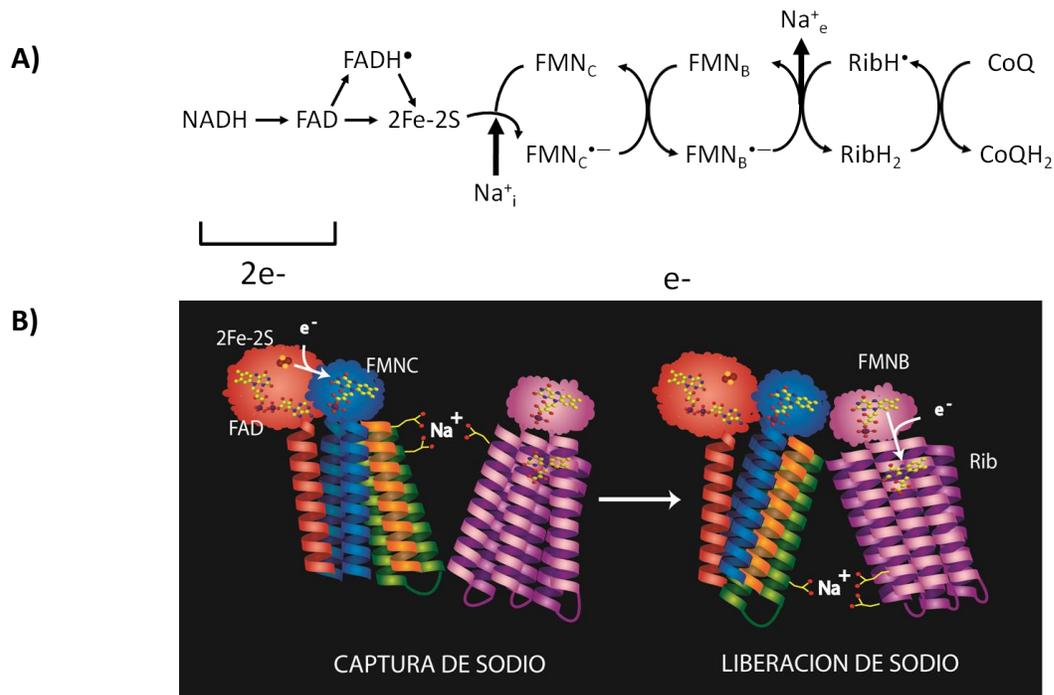


Figura 7. A) Vía de transferencia de electrones y B) Mecanismo conformacional de bombeo de sodio.

Estudios anteriores soportaban diversas partes de este esquema de trabajo, por ejemplo se había descrito con anterioridad, mediante el estudio de la estructura de la enzima, que la molécula de FAD se encuentra en una posición en la que puede interactuar con el NADH y el centro 2Fe-2S, ya que los tres se encuentran en la subunidad F. Otros estudios demostraban que el centro FMN_B es capaz de interactuar con el radical neutro de riboflavina, puesto que al eliminarse FMN_B las propiedades del radical neutro se modificaban. Una de las características interesantes de este modelo de transporte de electrones es que los electrones se desplazarían gradualmente entre los centros redox, sin sitios claros de acoplamiento como los descritos para otras bombas redox. Además de caracterizar el orden en que los electrones se mueven, pudimos describir las constantes de velocidad de diferentes pasos. Los trabajos de Bogachev y cols. han demostrado en el primer paso en el transporte de electrones es la reducción por dos electrones a nivel de la molécula del FAD, con una velocidad de

3500 s⁻¹, la cual es la reacción más rápida de todo el ciclo catalítico. En la siguiente reacción, el par de electrones se separa y un electrón se mueve hacia el centro 2Fe-2S, mientras que el otro permanece en el FAD, convirtiéndolo en un radical de flavina de tipo neutro. La velocidad de esta reacción también es alta (1000 s⁻¹).

En el siguiente paso, el electrón del centro 2Fe-2S es transferido a la molécula de FMN en la subunidad C. Esta reacción es el paso limitante y además es el paso que es regulado por sodio. En ausencia de sodio la velocidad es de < 30 s⁻¹ y en presencia de concentraciones saturantes, llega a ser de 150 s⁻¹. Después de este punto, los electrones se mueven a la molécula de FMN en la subunidad B y posteriormente a la riboflavina con una velocidad que de acuerdo a nuestras simulaciones debe ser mayor de 500 s⁻¹. Finalmente los electrones son donados a la ubiquinona, con una velocidad >300 s⁻¹. Nuestros experimentos han demostrado que la forma de la enzima con cuatro electrones, dos de ellos en el FAD, uno en el centro 2Fe-2S y uno más moviéndose a través de los FMNs y la riboflavina, es la forma funcional o catalítica de la enzima. Sin embargo, Na⁺-NQR puede aceptar hasta 7 electrones (mas uno que se encuentra en la riboflavina), en particular en la molécula de FMNB puede aceptar dos electrones y FMNB uno. Además, las formas de más de cuatro electrones no forman parte del ciclo catalítico puesto que las constantes de reacción son muy lentas.

2.3.1.4 Mecanismo de bombeo iónico.

Anteriormente se habían propuesto varios modelos para describir el mecanismo de transporte de electrones y de bombeo de sodio en Na⁺-NQR. En muchos casos se propuso que los cofactores en forma de radical, los cuales podrían provenir del centro 2Fe-2S, de las flavinas o de la ubiquinona, podrían estar directamente involucrados en el bombeo de sodio. Estos modelos estaban basados en un modelo de “acoplamiento directo”, en el que el cofactor en forma de radical al encontrarse en un medio hidrofóbico podría interactuar directamente con el sodio, capturándolo. Al transferir los electrones al siguiente centro redox, el sodio sería liberado en el lado opuesto de la membrana, lo cual produciría un bombeo iónico neto. Los modelos en los que la

ubiquinona participaba de esta forma fueron bien recibidos, puesto que este mecanismo sería semejante a los mecanismos de bombeo del complejo bc_1 y del complejo I. Sin embargo, el uso de estos modelos se vio limitado debido al conocimiento incompleto que se tenía sobre la composición de los cofactores, en particular en ninguno de los modelos propuestos previamente se tiene en cuenta que la enzima presenta más de una molécula de flavina y que al menos dos flavinas se encuentran en forma de radical, dependiendo del estado redox. Además, estos modelos no tomaban en cuenta que para estabilizar al sodio se requieren seis ligandos (en vez de uno solo) y que además estos modelos no son suficientes para explicar la selectividad de la enzima por sodio.

Para aclarar el mecanismo de bombeo iónico de la enzima, en nuestro grupo realizamos un estudio de la transferencia de electrones en mutantes en la cuales el sitio de unión de sodio y el canal por el que el sodio es liberado fueran alterados, al cambiar los residuos ácidos por residuos no polares, los cuales no podrían interactuar con el sodio [43]. Nuestros estudios demostraron que no hay un solo cofactor que controle tanto la salida como la entrada del sodio, en vez de eso existe dos transiciones redox involucradas en la captura y expulsión de iones. La unión del sodio se lleva a cabo en el paso en el que el electrón es transferido del centro 2Fe-2S a la molécula de FMN en la subunidad C. La expulsión del sodio ocurre cuando un electrón es transferido de la molécula de FMN en la subunidad B a la riboflavina. Estos datos indican que los cofactores no funcionan como “sitios de acoplamiento”, sino que al llevarse a cabo ciertos procesos redox, la enzima se modificaba, posiblemente mediante cambios conformacionales, los cuales están involucrados en el transporte de sodio. Un esquema hipotético que reúne nuestras observaciones es presentado en la figura 7B.

2.3.2 Papel de Na⁺-NQR en la patogenicidad.

A pesar de que el papel del ciclo del sodio en la patogenicidad no ha sido caracterizado con detalle, la evidencia disponible indica que tiene un rol importante, en particular a través de Na⁺-NQR, la cual es la bomba más importante en muchas bacterias. La evidencia indica que Na⁺-NQR tiene un papel esencial en la fisiología de muchos patógenos. Por ejemplo, se ha demostrado que los niveles de expresión de Na⁺-NQR incrementan durante la infección de *Vibrio cholerae* del tracto digestivo. Además, la técnica de mutagénesis por inserción azarosa también demostró que la inactivación del operón de Na⁺-NQR reduce drásticamente la infectividad de *V. cholerae*. También se ha demostrado que la actividad de esta enzima regula indirectamente la expresión de los factores de virulencia, tales como la toxina del cólera y varias de las subunidades del pili co-regulado por toxinas, a través de la modulación de la cascada regulatoria de ToxR, TcpP and ToxT. Se ha propuesto que las proteínas transmembranales TcpP y TcpH podrían ser los receptores encargados de sensar la osmolaridad y la motilidad celular, modulando la transcripción de los factores de virulencia.

Por otro lado, en *Klebsiella pneumoniae*, la actividad de Na⁺-NQR es crucial en la sobrevivencia de las células en concentraciones fisiológicas de sodio y tiene un papel metabólico importante bajo condiciones anaerobias [44], el cual es similar al ambiente en el que se encuentran cuando producen el biofilme, que a su vez se produce en la infección del tracto respiratorio. En *C. trachomatis*, se ha demostrado que durante la diferenciación de la forma de dispersión (cuerpo elemental) a la forma multiplicativa (cuerpo reticulado), la expresión de Na⁺-NQR y de otras enzimas involucrados en la actividad respiratoria aumenta dramáticamente [45]. Finalmente, nuestros resultados con *P. aeruginosa* demuestran que Na⁺-NQR es muy activa en los estadios tempranos del crecimiento y posiblemente en condiciones semejantes a las encontradas durante la colonización de esta bacteria.

2. Conclusión

Con el advenimiento de la era genómica, se han podido encontrar nuevos mecanismos utilizados por las bacterias patógenas para colonizar al hospedero. Entre estos se encuentra el uso de los ciclo del sodio, para llevar a cabo una diversidad de funciones y para sostener el metabolismo intermediario y energético. Se ha mostrado que Na⁺-NQR es una de las proteínas fundamentales para diversos organismos patógenos, por lo cual el estudio de su mecanismo de reacción, así como de su regulación a nivel genética, resulta importante. En particular, porque las células humanas carecen de esta enzima [20], por lo que puede ser un blanco quimioterapéutico.

Referencias

1. Leblanc, G., Pourcher, T., y Bassilana, M. (1989) *Biochimie* **71**, 969-979.
2. Nikaido, H. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 581-589.
3. Sadée, W., Drübbisch, V., y Amidon, G. L. (1995) *Pharm. Res.* **12**, 1823-1837.
4. Häse, C. C., Fedorova, N. D., Galperin, M. Y., y Dibrov, P. A. (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **65**, 353-370.
5. Skulachev, V. P. (1989) *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**, 635-647.
6. Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K., y Häse, C. C. (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2668-2670.
7. Häse, C. C., y Barquera, B. (2001) *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**, 169-178.
8. Dibrov, P., Dibrov, E., Pierce, G. N., y Galperin, M. Y. (2004) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* **8**, 1-6.
9. Dibrov, P. (2005) *T Biochemistry Mosc.* **70**, 150-153.
10. Dimroth, P., y Schink, B. (1998) *Arch. Microbiol.* **170**, 69-77.
11. Jeong, H. S., y Jouanneau, Y. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 1208-1214.
12. Biegel, E., Schmidt, S., González, J. M., y Müller, V. (2011) *Cell. Mol. Life Sci* **68**, 613-634.
13. Juárez, O., y Barquera, B. (2012) *Biochimica et biophysica acta* [online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22465856> (Accessed July 12, 2012).
14. Verkhovskiy, M. I., y Bogachev, A. V. (2010) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1797**, 738-746.
15. Gottschalk, G., y Thauer, R. K. (2001) *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**, 28-36.
16. Padan, E., y Schuldiner, S. (1994) *Biochim. Biophys. Acta.* **1187**, 206-210.
17. Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y., y Dover, N. (2001) *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**, 144-157

18. Padan, E., Bibi, E., Ito, M., y Krulwich, T. A. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1717**, 67-88.
19. Dimroth, P. (1991) *Bioessays*. **13**, 463-468.
20. Yagi, T. (1991) *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 211-225.
21. Kerscher, S., Dröse, S., Zickermann, V., y Brandt, U. (2008) *Results Probl Cell Differ.* **45**, 185-222.
22. Lunin, V. Y., Lunina, N. L., Casutt, M. S., Knoops, K., Schaffitzel, C., Steuber, J., Fritz, G., y Baumstark, M. W. (2012) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 724-731.
23. Edwards, A. M. (2007) in *Flavins Photochemistry and Photobiology* [online] <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9780854043316-00001/978-0-85404-331-6> (Accessed September 28, 2012).
24. Barquera, B., Zhou, W., Morgan, J. E., y Gennis, R. B. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 10322-10324.
25. Juárez, O., Nilges, M. J., Gillespie, P., Cotton, J., y Barquera, B. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 33162-33167.
26. Hayashi, M., Nakayama, Y., y Unemoto, T. (2001) *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**, 37-44.
27. Casutt, M. S., Nediakov, R., Wendelspiess, S., Vossler, S., Gerken, U., Murai, M., Miyoshi, H., Möller, H. M., y Steuber, J. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 40075-40082.
28. Duffy, E. B., y Barquera, B. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 8343-8351.
29. Backiel, J., Juárez, O., Zagorevski, D. V., Wang, Z., Nilges, M. J., y Barquera, B. (2008) *Biochemistry.* **47**, 11273-11284.
30. Juárez, O., Athearn, K., Gillespie, P., y Barquera, B. (2009) *Biochemistry* **48**, 9516-9524.
31. Barquera, B., Nilges, M. J., Morgan, J. E., Ramirez-Silva, L., Zhou, W., y Gennis, R. B. (2004) *Biochemistry.* **43**, 12322-12330.
32. Rich, P. R., Meunier, B., y Ward, F. B. (1995) *FEBS Lett.* **375**, 5-10.
33. Massey, V. (2000) *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 283-296.
34. Barquera, B., Morgan, J. E., y Lukoyanov, D., Scholes, C. P., Gennis, R. B., and Nilges, M. J. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 265-275.
35. Kulik, L., Pivtsov, A., y Bogachev, A. (2010) *Applied Magnetic Resonance.* **37**, 353-361.
36. Juárez, O., Morgan, J. E., y Barquera, B. (2009) *J. Biol. Chem* **284**, 8963-8972.
37. Bogachev, A. V., Belevich, N. P., Bertsova, Y. V., y Verkhovsky, M. I. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 5533-5538.
38. Neehaul, Y., Juárez, O., Barquera, B., y Hellwig, P. (2012) *Biochemistry.* **51**, 4072-4077.
39. Kim, Y. C., Wikström, M., y Hummer, G. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **104**, 2169-2174.
40. Pfenninger-Li, X. D., Albracht, S. P., Van Belzen, R., y Dimroth, P. (1996) *Biochemistry* **35**, 6233-6242.

41. Zhou, W., Bertsova, Y. V., Feng, B., Tsatsos, P., Verkhovskaya, M. L., Gennis, R. B., Bogachev, A. V., y Barquera, B. (1999) *Biochemistry* **38**, 16246-16252.
42. Juárez, O., Shea, M. E., Makhatadze, G. I., y Barquera, B. (2011) *J. Biol. Chem* **286**, 26383-26390.
43. Juárez, O., Morgan, J. E., Nilges, M. J., y Barquera, B. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **107**, 12505-12510.
44. Bertsova, Y. V., y Bogachev, A. V. (2004) *FEBS Lett* **563**, 207-212.
45. Belland, R. J., Zhong, G., Crane, D. D., Hogan, D., Sturdevant, D., Sharma, J., Beatty, W. L., y Caldwell, H. D. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 8478-8483.

Semblanza del Dr. Oscar Juárez

Realizó sus estudios de licenciatura en la Facultad de Ciencias, UNAM, obteniendo el grado de Biólogo y la medalla “Gabino Barreda”, en 2001. Posteriormente ingreso al programa de doctorado en Ciencias Biomédicas en la Facultad de Medicina, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo Pardo. Sus estudios de doctorado se enfocaron en los mecanismos de producción de energía y de adaptación metabólica de hongos patógenos, así como la resistencia a ciertos fungicidas, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la actividad mitocondrial.

Se incorporó como investigador posdoctoral en el laboratorio de la Dra. Blanca Barquera, Departamento de Biología, Rensselaer Polytechnic Institute, y después de tres años fue incorporado a la planta académica del instituto, como Investigador Asociado, y desde 2011 como Profesor–Investigador. Durante este tiempo, sus estudios se han enfocado en dilucidar, desde el punto de vista molecular, el mecanismo catalítico de la NADH deshidrogenasa dependiente de sodio, la cual es principal bomba iónica de *Vibrio cholerae*. En su trayectoria científica ha publicado 14 artículos de investigación. Algunas aportaciones de su trabajo son: el discernimiento de la vía de transporte interno de electrones de la NADH deshidrogenasa dependiente de sodio, el mecanismo de acoplamiento molecular, así como la identificación y caracterización de diversos motivos estructurales en esta enzima. Actualmente estudia el papel del metabolismo del sodio en la infección por bacterias patógenas, especialmente en *Chlamydia trachomatis* y *Vibrio cholerae*, el desarrollo de fármacos quinoloides para interrumpir la homeostasis iónica de patógenos y el estudio de los mecanismos moleculares que permiten el bombeo de sodio.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 41 – 68, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.
(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

EL ACCESO RESTRINGIDO A LA ALIMENTACIÓN COMO UN SISTEMA EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR LA REGULACIÓN CIRCADIANA DEL METABOLISMO DURANTE EL CICLO DE AYUNO-REALIMENTACIÓN

RESTRICTED ACCESS TO FOOD AS AN EXPERIMENTAL SYSTEM TO STUDY THE CIRCADIAN REGULATION OF METABOLISM DURING THE CYCLE OF FAST-FEEDBACK

**Moisés Pérez-Mendoza*, Julieta Rivera-Zavala*, Marlen Valdés-Fuentes*,
Olivia Vázquez-Martínez* y Mauricio Díaz-Muñoz**

Instituto de Neurobiología, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular,
Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro 76230, QRO. MÉXICO.
e-mail: mdiaz@comunidad.unam.mx

* La contribución de estos autores fue similar, por lo que sus apellidos están ordenados de forma alfabética

Resumen

La actividad fisiológica está influida por el reloj circadiano, por lo que la inmensa mayoría de respuestas conductuales, hormonales y metabólicas fluctúan durante el periodo de 24 h comprendido en los ciclos de luz-oscuridad asociados a la rotación de la Tierra. El control principal de esta ritmicidad es ejercido en los mamíferos desde el hipotálamo, por la actividad cíclica del núcleo supraquiasmático. Sin embargo, se ha reconocido recientemente que

existe un reloj alternativo que en lugar de responder a la luz, es sincronizado por la accesibilidad al alimento. Este reloj biológico, del cual se desconoce su localización anatómica, se le conoce como Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA). La expresión del OSA se consigue al restringir la alimentación de cada día a un periodo corto de tiempo (~2 h), y prolongar esta forma de comer hasta 3 semanas. El protocolo implica en cada día la alternancia de un periodo largo sin alimento (22 h) y sólo un tiempo limitado para la ingesta de alimento (2 h). En consecuencia, la expresión del OSA se visualiza como una adaptación de la fisiología circadiana a una forma de comer que conlleva ciclos repetitivos de un ayuno prolongado seguido por una ingesta de comida muy intensa y abundante.

En esta revisión se hace un compendio de las principales adaptaciones endócrinas y de los cambios bioquímicos del hígado que acompañan la expresión del OSA. Los resultados ponen de manifiesto una conexión entre el reloj molecular y las redes metabólicas, con influencias mutuas y complementarias. Asimismo, se constata que la expresión del OSA confiere al organismo una manera nueva y diferente de modular su fisiología, que la distingue de los cambios asociados a los ciclos simples de ayuno de un día y realimentación.

Los datos generados con este modelo experimental tienen la potencialidad de hacernos comprender mejor la relación entre los ritmos biológicos y algunas patologías, y entender de mejor forma cómo la desregulación circadiana puede favorecer entidades nosológicas como la obesidad, la diabetes o el síndrome metabólico.

Palabras clave: Fisiología circadiana, alimentación, osciladores biológicos, metabolismo hepático

Summary

Physiological activity is influenced by the circadian system, hence, most of the behavioral, hormonal and metabolic responses show diurnal variations related to the light-dark cycles associated to the rotational movement of the Earth. The principal pacemaker in vertebrates is located in the hypothalamus within the suprachiasmatic nuclei. However, an alternative clock has been recognized that is independent of light synchronization but is entrained by food access. The anatomical location of this oscillator is still unknown, and is known as the Food entrained oscillator (FEO). The FEO expression implicates a restricted feeding schedule (2 h of food access per day) during 3 weeks. This feeding protocol involves a long fasting time (22 h) and a short mealtime (2 h). Hence, the FEO expression consists in a repetitive cycles of long fasting and brief period of intense and abundant feeding.

In this review we mention the mean endocrine adaptations as well as the biochemical modifications in the liver that are associated to the FEO expression. The result indicates a strong link between the molecular circadian clock and the metabolic pathways, with complementary and mutual influences. In addition, it is shown that the FEO promotes a new and different way of physiological

modulation in contrast to the changes related to a single cycle of 24 h fasting followed by 2 h of meal time.

The data obtained with this experimental protocol have potentially allow us a better comprehension of the relationship between biological rhythms and some pathologies, and at the same time, to understand how circadian des-regulation can promote health alterations such as obesity, diabetes and the metabolic syndrome.

Keywords: Circadian physiology, nutrition, biological oscillators, hepatic metabolism

Metabolismo y Reloj Molecular

Los relojes biológicos son adaptaciones fisiológicas que están codificadas genéticamente y permiten al organismo adecuar su fisiología a los cambios luz-obscuridad ambiental asociados a la rotación de la Tierra.

Aunque hay especies que presentan actividad, ya sea diurna o nocturna, dentro de una misma población se reconocen sujetos con diversos cronotipos. Por ejemplo, en los humanos hay personas que son “alondras” y se levantan muy temprano, mientras que otras son “búhos” y permanecen despiertos hasta muy noche.

La genética moderna ha identificado las vías moleculares que dictan el ritmo circadiano de 24 horas. Estos avances permiten entender porque la vida en las actuales sociedades industrializadas con la luz artificial, el trabajo nocturno, la reducción del tiempo normal de dormir, los viajes o la desorganización temporal, descontrolan el patrón adaptativo al ciclo luz-obscuridad del reloj interno, que ha sido programado a través de la evolución para funcionar con un periodo aproximado de 24 h.

La identificación de un reloj molecular permite entender los desórdenes en el ritmo circadiano y los patrones de sueño en todos los organismos, incluidos los humanos.

Para denominar a un oscilador circadiano como tal, se deben definir ciertas características: persistencia y sostenimiento de la longitud del periodo bajo condiciones constantes, sincronía con las señales ambientales, como la luz, y estabilidad a través de múltiples variaciones en la temperatura.

Los primeros avances en la caracterización del reloj circadiano se hicieron en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, dándose a conocer el concepto de que los relojes se componen de un asa de retroalimentación transcripcional autorregulatoria, con un inicio activador que promueve la transcripción de una serie de represores, que a su vez tienen una retroalimentación para inhibir la expresión y función de genes en un ciclo que se repite a sí mismo cada 24 h. En este sentido se ha identificado una serie de genes y sus respectivas proteínas los cuales participan en la generación de la ritmicidad circadiana, a través de un asa positiva como los genes *Clock* y *Bmal* y un asa negativa *Per* y *Cry*, otros genes que participan de manera importante son *Rev-erb- α* , *Ror- α* y *Dec*. A este conjunto de genes se les ha denominado “genes reloj” [1].

Una característica de los ritmos circadianos que emerge de los estudios moleculares es que las características canónicas del reloj están genéticamente programadas. La mala coordinación entre la longitud del periodo y la sincronización al inicio del periodo luminoso, repercute en la estabilidad del sistema, ya que los ciclos de reparación y daño del DNA se descontrolan. Alternativamente esta mala coordinación puede desencadenar procesos bioquímicos incompatibles, como un descontrol en la fase de oxidación o reducción dentro del ciclo metabólico.

Ya se han identificado las vías sensoriales en el cerebro que sincronizan el reloj independientemente de la formación de la imagen visual. Actualmente se sabe que la respuesta luminosa también sincroniza las neuronas y los relojes periféricos por medio del control del marcapaso maestro conocido como

núcleo supraquiasmático (NSQ). Esto en condiciones de alimentación *ad libitum* [1].

La mayoría de las especies conocidas, desde las bacterias hasta los humanos, han desarrollado un sistema temporal circadiano que los prepara para alternar periodos de ingesta de alimento y periodos de ayuno. Hay diversas evidencias que indican que existe una relación estrecha entre el reloj circadiano y el metabolismo; y que alteraciones en el sistema temporal puede desencadenar enfermedades metabólicas tales como obesidad, diabetes o el llamado síndrome metabólico.

Variaciones diurnas del metabolismo

El NSQ se comunica con los osciladores periféricos a través de señales hormonales y del sistema nervioso autónomo. Entre los osciladores periféricos se reconocen varios órganos y tejidos, tales como el hígado, páncreas, estomago, intestino, incluso el tejido adiposo. Estos órganos también presentan los mecanismos moleculares para sostener su ritmicidad diurna, y en ciertas circunstancias son capaces de medir el tiempo de manera independiente al NSQ.

Un ejemplo de oscilación circadiana a nivel metabólico lo presentan las algas cianofitas. Las variaciones circadianas de estos organismos están sustentadas en un complejo de tan sólo 3 proteínas ahora llamadas “reloj” (KaiA, KaiB, KaiC). Con ATP disponible, este complejo funciona en un ciclo autosostenido de 24 h alternando los estados de fosforilación y defosforilación de sus componentes. El ciclo de reacción de estas cinasas y fosfatasa se mantiene constante a diferentes temperaturas, una propiedad que se sabe caracteriza a un oscilador circadiano. El simple recambio de ATP modula la fosforilación del ciclo, sugiriendo de inmediato que el ritmo del reloj podría estar acoplado a la actividad metabólica. Otra característica que conecta este oscilador central con el metabolismo, es que la actividad de los factores de transcripción del reloj es sensible al estado redox. El reloj molecular regula

también la expresión de enzimas metabólicas muy importantes para la gluconeogénesis como la fosfoenolpiruvato carboxicinas y la glucosa-6-fosfatasa [2].

Más recientemente, se ha encontrado que los ciclos de 24 h en el metabolismo se relacionan a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Existe la propuesta de que cuando los eucariontes divergieron de las bacterias hace millones de años, la oxigenación de la atmosfera provocó una ventaja adaptativa a estos organismos basada en un la coordinación de reacciones redox que pronto quedaron bajo el control del reloj circadiano.

Se sabe también que hay una extensa integración entre el sistema neuroendócrino y el sistema circadiano porque se ha visto que la integridad del reloj decae con la edad. Para tratar de entender qué factores asociados a la edad puede afectar la integridad del reloj circadiano, se han hecho experimentos en donde mutando algunos genes reloj se observa muerte prematura que correlaciona con el incremento de reacciones pro-oxidantes y la acumulación de especies reactivas de oxígeno. También se ha observado que hay alteraciones en la regeneración hepática principalmente en el acoplamiento del ciclo celular. Aunque no existen datos claros y contundentes, se sugiere fuertemente que existe una correlación muy cercana entre las alteraciones circadianas y el riesgo de padecer cáncer, aunque se necesitan todavía estudios más precisos para comprender mejor la relación entre el ciclo celular, el reloj molecular y la vías oncogénicas [1].

Enfermedades metabólicas

Un punto interesante que debe explorarse a fondo es determinar como los ritmos circadianos modulan la homeostasis y las vías que responden a los nutrientes para coordinar las señales ambientales y su influencia en la regulación del metabolismo energético. Es ampliamente aceptado que existe

una comunicación e influencia recíproca entre los componentes del reloj molecular y las diversas rutas del metabolismo intermedio.

Un punto importante por dilucidar es descubrir cómo el NSQ se comunica con todos los osciladores alternos, dentro y fuera del cerebro, para producir una fase coherente entre el metabolismo del organismo y el sistema circadiano. Ya se conoce que las células del NSQ siguen midiendo el tiempo aún fuera de su sitio anatómico; además que se sugiere que los factores secretados por ellas y las conexiones del sistema nervioso autónomo, contribuyen a la sincronización de los relojes periféricos, aunque la naturaleza de estas vías de comunicación es todavía incipiente.

Las áreas que reciben proyecciones directas del NSQ, como la vía que va a la zona hipotalámica dorso-medial, ha sido implicada en la anticipación a la comida, aunque es posible que otros centros diencefálicos y mesencefálicos estén también involucrados.

Se han efectuado una gran cantidad de estudios para entender cómo la disponibilidad del alimento a horas diferentes a las tradicionales, causa un desplazamiento en la ritmicidad del reloj periférico hepático, sin alterar el marcapasos cerebral central. Una vía importante que sincroniza el oscilador hepático en el momento en que hay disponibilidad de comida, involucra la señalización de los glucocorticoides y la regulación de la temperatura corporal.

Cuando se administran dietas altas en grasa en un periodo circadiano incorrecto, se acelera la ganancia de peso corporal en comparación con animales que comen en el periodo circadiano correcto.

Las herramientas genéticas que inciden de manera directa en el reloj interno, crean oportunidades para analizar las bases moleculares de ciertas patologías metabólicas, como el infarto de miocardio matutino y las crisis de hipertensión. Los factores que se conjugan para que se incremente el riesgo de

infarto al miocardio en las mañanas son múltiples, entre algunos de los que se cree son decisivos está la síntesis diurna de los factores transcripcionales que activan los promotores de citosinas pro-trombóticas. Así mismo, se ha reportado que la arritmia cardíaca ocurre frecuentemente en la mañana debido al control de la expresión de los canales de potasio por genes reloj de las células cardíacas. La fisiología circadiana también influye en la contractibilidad y en el metabolismo oxidativo. Estos efectos vasculares del reloj molecular causan variaciones en la presión sanguínea a lo largo del ciclo luz-obscuridad.

Otros estudios relacionados con el control del metabolismo de la glucosa circulante también han arrojado evidencias interesantes sobre la interacción reloj molecular-metabolismo. La ausencia del gen *Clock* hace que ratones presenten hiperglicemia, que sean más susceptibles a desarrollar obesidad en los primeros meses de vida, y que con el avance de la edad se vuelvan hipoinsulinémicos.

Estudios experimentales del Síndrome Smith-Magenis, que se caracteriza por anormalidades neuronales, de comportamiento, déficit intelectual, obesidad y alteraciones del sueño, han dado evidencias de la conexión entre la expresión alterada del gen *Clock* y alteraciones en las vías energéticas celulares. Esta interacción ha sustentado la hipótesis de que las características moleculares de los elementos del reloj molecular pudieran predecir el riesgo de que los humanos padezcan desórdenes metabólicos. En la actualidad se sabe que personas que laboran en horarios nocturnos de trabajo con la consecuente alteración del ritmo circadiano, padecen un gran número de enfermedades metabólicas como diabetes tipo 2, obesidad, desórdenes gastrointestinales y del dormir, y una predisposición al cáncer.

Cualquier alteración que se le imponga al ritmo circadiano tiene consecuencias metabólicas adversas en el organismo. Por ejemplo, el hecho aparentemente simple de alterar la hora de ir a dormir por reuniones sociales en los fines de semana, se ha asociado al incremento en el peso corporal.

En general, la interacción mutua del reloj molecular y el metabolismo intermediario se basa en la interfase que entre estos 2 sistemas se establece a varios niveles de enlace: 1) las proteínas reloj son susceptibles de ser reguladas directamente por coenzimas redox (NAD⁺/NADH), 2) las proteínas reloj son fosforiladas por cinasas cuya actividad depende directamente del metabolismo (AMPK), 3) el reloj molecular incide sobre canales y ATPasas que manejan calcio intracelular, y la dinámica del calcio es uno de los eslabones principales del control metabólico, 4) los receptores nucleares están bajo control circadiano, y éstos son los principales coordinadores de la respuesta de ayuno del metabolismo hepático y del tejido adiposo [2].

Por lo tanto, la relación del reloj circadiano con todos los osciladores y las vías metabólicas permiten una coordinación del sistema temporal del organismo con los ciclos de ayuno y alimentación, y esto representa una de las bases principales de la adaptación que presentan los organismos a diferentes estrategias en el consumo y procesamiento del alimento.

El acceso al alimento como un sincronizador de los ritmos biológicos

El ambiente no es constante y se pueden presentar fluctuaciones que imponen a los organismos retos de adaptación y supervivencia. En consecuencia, surgen en cada organismo sistemas de regulación fisiológica capaces de anticipar y oscilar a la par con los fenómenos externos. Entonces la presencia de los ritmos biológicos en los seres vivos capacita una acción adaptativa de índole temporal que permite predecir los cambios ambientales y así poder anticipar su ocurrencia. Un fenómeno importante en la biología de los ritmos biológicos es la sincronización, que es definida como un ajuste de los ritmos internos a eventos ambientales externos. Este proceso puede sustentarse por la luz, interacciones sociales y conductuales, la temperatura, el estatus metabólico y por el alimento [3].

Aunque en los mamíferos el NSQ es reconocido como el reloj o sincronizador maestro, principalmente sincronizado por ciclos de luz-oscuridad, existe otro reloj alternativo que se expresa cuando se restringe el periodo de alimentación [4, 5]. La capacidad de las especies de anticipar el horario de alimentación para prepararse y optimizar la ingesta y digestión del alimento, es un fenómeno clave de la evolución. Estudios en el NSQ han servido para identificar la maquinaria molecular que controla la ritmicidad cercana a ciclos de 24 h. Gracias al desarrollo de estrategias moleculares e inmuno-histoquímicas, en años recientes se ha determinado que la expresión de los elementos del reloj molecular se ubican también en muchos tejidos periféricos, como el hígado, corazón, músculo, tejido adiposo, páncreas, riñón, pulmón, entre otros [6, 7].

Cuando el acceso del alimento se restringe diariamente en animales de laboratorio, se expresa un reloj el cual se ha denominado Oscilador Sincronizado por Alimento (OSA). Durante la expresión de este reloj, se han observado cambios conductuales que anteceden al evento de alimentación, al menos 3 h previas al acceso de alimento, el cual se conoce como actividad anticipatoria al alimento (AAA). Curt Richter (1922) observó que cuando a las ratas se les presentaba diariamente sólo por 25 min el alimento, aumentaba la actividad locomotriz unas horas previas a la presentación del alimento. Estas observaciones fueron recapituladas en los 50's por Reid y Finger (1955). Sin embargo, Bolles y Stokes (1965) confirmaron que esta AAA, era un fenómeno circadiano [8].

La primera estructura que se propuso como centro generador del la AAA fue el hipotálamo, ya que esta zona cerebral está involucrada en la ingesta de alimento y agua, el control de la temperatura, la secreción de hormonas y forma parte de la coordinación con el sistema nervioso autónomo [8]. Se sabe que dentro de esta estructura se encuentran caracterizados centros de saciedad, a nivel del hipotálamo ventromedial y del apetito, en el hipotálamo lateral. No

obstante, las lesiones electrolíticas a estas estructuras no repercutieron en el fenómeno de la sincronización por el alimento [9].

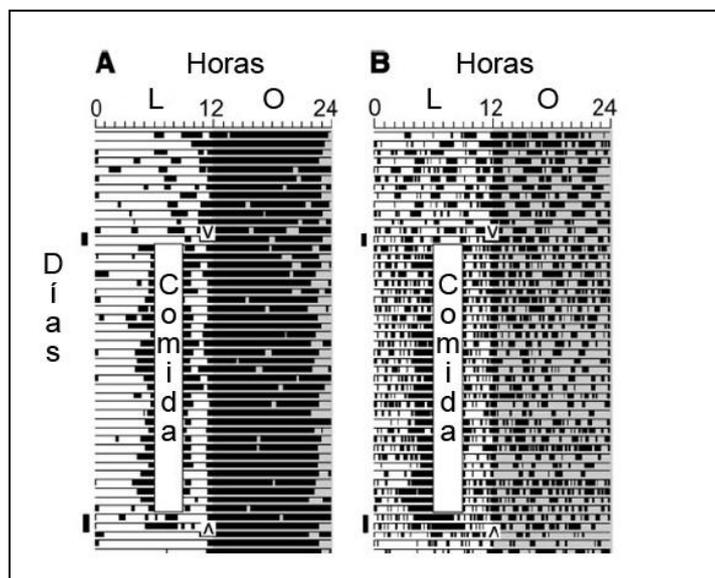


Figura 1. Registro representativo de actividad locomotriz sin lesión (A) y con lesión a nivel del núcleo hipotalámico dorsomedial (B). El acceso restringido del alimento fue de 3 h, barra azul, V comienzo de la restricción y V invertida, fin de la restricción (Modificado de Landry, et al., 2006) [12].

Esta AAA se distingue por presentar ciertas características como son: aumento de la temperatura, niveles altos de corticosterona, movilización de diversos metabolitos, incremento de la actividad locomotriz, importantes alteraciones en el metabolismo intermedio del hígado, etc. [5, 8, 10]. Esta actividad anticipatoria claramente depende de un oscilador circadiano independiente del NSQ, ya que persiste en animales con lesión bilateral de este núcleo y bajo condiciones de luz constante como lo demostraron Stephan y colaboradores (1979, 1992) [11]. Una característica importante es que la AAA se produce cuando el acceso a la comida se da en rangos cercanos a las 24h, y persiste por algunos ciclos bajo condiciones de ayuno (Figura 1).

De forma paralela, el estudio de la actividad anticipatoria se ha utilizado como una herramienta para entender al OSA (como una salida de este reloj). Gooley y colaboradores (2001), tras realizar una lesión en el núcleo

hipotalámico dorsomedial, demostraron que la abolición de esta estructura suprimía temporalmente la AAA. Sin embargo, existe una sincronización consistente en tejidos periféricos como el hígado, el esófago, el estómago y el colon [13]. Un aspecto importante de la AAA es que desaparece enseguida por la alimentación *ad libitum* y como se mencionó antes, persiste en condiciones de ayuno durante varios días. Además se sabe que es susceptible a retrasos o avances en su fase, debido a los cambios en el horario en el que se le presenta el alimento y que es sensible parcialmente a mutaciones de algunos genes reloj, como *Cry* y *NPAS2* [10, 14]. Actualmente, se desconoce cuál es el sustrato anatómico del OSA.

El alimento ha mostrado ser un sincronizador potente de los ritmos circadianos, especialmente en un ambiente natural, donde el acceso al alimento se restringe a ciertas horas del día y consecuentemente muchas especies tienen que optimizar su conducta en función de las horas de alimentación. El entendimiento de la relación entre los órganos periféricos y el OSA es fundamental para comprender su funcionamiento. El OSA es capaz de provocar cambios en la fase de algunos ritmos circadianos como son diferentes hormonas, tales como la insulina, el glucagón y la corticosterona [15], la leptina [16], la dinámica de metabolitos energéticos como los triacilglicéridos, cuerpos cetónicos y ácidos grasos [17-19]. Otra de las modificaciones importantes que tiene el OSA es que conlleva modificaciones en la carga energética, estado redox y actividad mitocondrial. Aceves y colaboradores (2003) demostraron que durante la AAA se presentaba en el hígado un estado hipotiroideo, mientras que al final de la alimentación se cambiaba a hipertiroideo [20]. Otros cambios relevantes tienen que ver con la expresión de genes implicados en procesos celulares y los propios genes reloj [21].

El hígado al ser un órgano vital para el manejo de los nutrientes y por lo tanto del metabolismo intermediario, es considerado como parte fundamental de este oscilador y por lo tanto de la sincronización presente ante la instalación del OSA.

El ayuno como entidad metabólica y fisiológica

El ayuno se define como el tiempo transcurrido desde la última ingesta de alimento y comprende una serie distintiva de adaptaciones fisiológicas que van desde el aprovechamiento de la comida recién ingerida y el concomitante almacenamiento de reservas energéticas, seguido por una degradación del glucógeno hepático y una posterior movilización de las reservas lipídicas. Usualmente estos eventos son suficientes para promover la búsqueda de alimento, pero en el caso de que el ayuno se vuelva extremo, el organismo recurre a otras estrategias como el consumir todas las reservas del tejido adiposo e incluso la movilización de moléculas energéticas del tejido muscular. Ante la falta de nutrientes el organismo activa mecanismos para la producción de sustratos energéticos que aseguren el metabolismo cerebral a costa de disminuir el metabolismo periférico. Si el ayuno es prolongado (días o semanas), el sistema responde con la utilización de fuentes alternas de energía y disminución del gasto proteico [22].

La disminución en los niveles de glucosa (~60 mg/dL) induce la secreción glucagón e inhibe la secreción de insulina, de las células α y β del islote pancreático, respectivamente. La relación de estas hormonas regula las interrelaciones metabólicas de los órganos en respuesta a la falta de glucosa [23]. La hipoglucemia consecuencia del ayuno también induce la secreción de adrenalina y corticosterona, hormonas secretadas por la médula y corteza suprarrenal. La adrenalina inhibe la secreción de insulina y estimula la glucogenólisis en hígado y músculo; los glucocorticoides suprimen la secreción de insulina, inhiben la captación de la glucosa por los tejidos periféricos, promueven la gluconeogénesis, el catabolismo proteico y regulan la movilización de ácidos grasos libres (AGL) [23, 24].

El ayuno comprende tres fases:

Fase postabsortiva, comprende de 6 a 24 h después de haber comenzado el ayuno. Fase en la cual los requerimientos de glucosa por el cerebro son mantenidos principalmente por la glucogenólisis hepática [22].

Fase de ayuno temprano, comprende de 2 a 10 días (Figura 2). Fase gluconeogénica durante la cual los requerimientos de glucosa son cubiertos por el hígado mediante el uso de amino ácidos, lactato, piruvato y glicerol provenientes del tejido muscular y adiposo [22].

Fase de ayuno tardío (inanición), comprende más de 10 días (Figura 2). Fase de movilización total de las reservas lipídicas (lipólisis máxima) para uso de los AGL y aumento en los niveles de los cuerpos cetónicos. Consumo de proteína muscular como fuente de sustrato gluconeogénico [22].

Durante la fase de postabsortiva el glucagon estimula la glucogenólisis del hígado y del músculo. El glucógeno hepático no es suficiente para satisfacer los requerimientos del cerebro y los glóbulos rojos después de algunas horas, ya que los niveles de este polisacárido comienzan a declinar 8 h después de una comida [22].

Cuando las reservas de glucógeno se agotan el organismo entra a la fase de ayuno temprano, y la glucosa circulante se sostiene principalmente por la actividad gluconeogénica del hígado. Los sustratos por excelencia de este proceso son el piruvato y el lactato, producto de la oxidación parcial de la glucosa, el glicerol como residuo lipolítico, y la alanina, que se forma por la degradación de proteínas en el músculo. Estas unidades de 3 carbonos ingresan a la circulación, son captadas y recicladas por el hígado (~10% riñón) para la producción de glucosa [25]. De la glucosa formada por la gluconeogénesis el 70% es consumida por el cerebro, el 10 % por el corazón y el 7 % por otros músculos [26, 27].

Durante la transición de ayuno temprano y ayuno tardío, los niveles crecientes de glucagon activan a la enzima lipasa hormono-sensible del tejido adiposo, la cual promueve la movilización de los AGL y el glicerol, productos de

la hidrólisis de los triacilglicéridos [28]. Los AGL actúan como fuente energética para todos los tejidos, a excepción del cerebro, los glóbulos rojos y la médula renal, además de aportar la energía para llevar a cabo la gluconeogénesis. Los AGL de cadena par son degradados a acetil-CoA, el cual ingresa al ciclo de Krebs para su metabolismo terminal a CO₂ y H₂O. Por otro lado, el glicerol y el propionil-CoA, derivado de los AGL de cadena impar, actúan como sustratos para la producción de glucosa a través de la gluconeogénesis [25].

En la fase de ayuno tardío o inanición, no llegan nutrientes a partir del intestino y las reservas de glucógeno hepático se han agotado, la gluconeogénesis toma un papel preponderante. El ciclo de Cori (producción de lactato en músculo y conversión del lactato a glucosa por el hígado) y el ciclo de alanina-glucosa (generación de alanina por el músculo y su transformación en glucosa por el hígado), juegan un papel importante en el aporte de glucosa. La glutamina acompaña a la alanina como sustrato gluconeogénico en condiciones extremas de inanición [25]. Durante esta fase las proteínas no son renovadas ni remplazadas, y se utilizan principalmente como fuentes de unidades de carbono para la síntesis de glucosa.

Las concentraciones de acetil-CoA formado por la oxidación de ácidos grasos aumentan y no pueden seguir el ciclo de Krebs, ya que el uso de esqueletos carbonados para la gluconeogénesis disminuye la cantidad de oxaloacetato. En el hígado el aumento de acetil-CoA lleva a la formación de cuerpos cetónicos (acetoacetato y β-hidroxiacetato), moléculas energéticas que son usadas por tejidos que no son totalmente dependientes de la glucosa. A medida que aumenta el tiempo de ayuno (~3 días), los niveles de cuerpos cetónicos incrementan, atraviesan la barrera hemato-encefálica y son metabolizados por el cerebro para obtener energía [29]. La cetosis es una adaptación para el ayuno tardío, proceso mediante el cual se elimina el exceso de carbonos de ácidos grasos del hígado. Conforme más AGL se oxidan, más cuerpo cetónicos se producen y disminuye la degradación del CO₂, esto conduce a una producción total constante de ATP en el hígado.

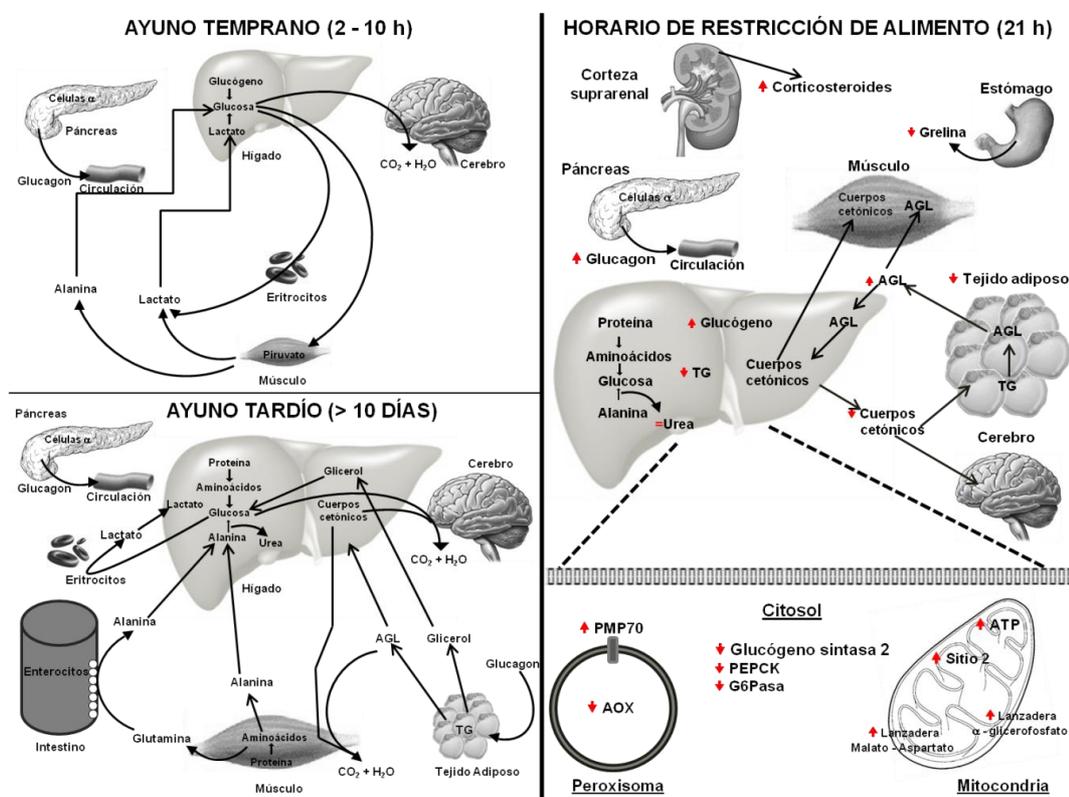


Figura 2. Dinámica de procesos metabólicos durante diferentes tipos de ayuno. Durante el ayuno temprano, de 2 a 10 h (arriba a la izquierda), se activa la fase gluconeogénica con sustratos como alanina, lactato, piruvato y glicerol. El ayuno tardío, más de 2 días (abajo a la izquierda), se maximiza la movilización de lípidos (AGL y cuerpos cetónicos) y de prolongarse se activa también el manejo de la proteína muscular. El horario de restricción de alimento (HRA) (panel de la derecha), comprende una ingesta de alimento de 2 h (12:00 a 14:00 h), un ayuno de 22 h (14:00 a 12:00 h), diariamente por 3 semanas, fase de movilización y aumento de AGL y cuerpos cetónicos, aumento en los niveles en sangre de corticosteroides. **AGL:** ácidos grasos libres, **ATP:** adenosíntrifosfato, **AOX:** acilCoA oxidasa, **G6Pasa:** glucosa 6 fosfatasa, **PEPCK:** fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, **PMP70:** proteína de membrana peroxisomal 70 y **TG:** triacilglicéridos. ▲ aumento del grupo de HRA (11:00 h) vs ayuno 24 h, ▼ disminución del grupo de HRA (11:00 h) vs ayuno 24 h, = sin cambios entre el grupo de HRA (11:00 h) vs ayuno 24 h.

Un tipo distinto de ayuno que forma parte de un protocolo experimental de alimentación conocido como horario de restricción al alimento (HRA) comprende un ayuno de 22 h con acceso de 2 h al alimento (de 12:00 a 14:00

h) diariamente por un período de 3 semanas (Figura 2). En este protocolo se puede explorar el comportamiento rítmico circadiano de parámetros de importancia fisiológica y metabólica. Observaciones realizadas antes del acceso a la comida (a las 11:00 h) al terminar la tercera semana de este protocolo de alimentación, han demostrado cambios significativos en hormonas, metabolitos y parámetros involucrados en el metabolismo energético. Los niveles en sangre de glucagon y AGL, los niveles en hígado de glucógeno, la proteína de membrana peroxisomal (PMP70), el ATP, la capacidad oxidativa del sitio 2 (succinato) de la cadena de transporte de electrones, el control respiratorio de la lanzadera malato-aspartato y la lanzadera α -glicerofosfato en la mitocondria y la ornitina transcarbamilasa, (enzima que participa en el ciclo de la urea) presentan un incremento al compararlos con un grupo control de ayuno simple de un sólo día [15, 18, 19, 30, 31]. En contraste, la proporción del tejido adiposo, niveles ghrelina circulante, glucógeno y triacilglicéridos hepáticos, la enzima peroxisomal acilCoA oxidasa [19], la enzima glucógeno sintasa, la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa); enzimas de la gluconeogénesis, y la carbamoil-fosfato sintetasa I (CPSI), enzima del ciclo de la urea, presentan una reducción significativa al compararlos contra un ayuno simple de un día.

Se han reportado complicaciones médicas en pacientes durante un ayuno prolongado. No fatales: dolor de cabeza, náusea, dolor abdominal, cansancio, gota, insuficiencia renal, porfiria, anemia. Fatales: obstrucción del intestino delgado, acidosis láctica y arritmia ventricular.

Adaptaciones a la ingesta de alimento y procesamiento de nutrientes

Los mecanismos que sustentan la ingesta de alimento y el subsiguiente balance de energía no implican específicamente un punto de referencia como la composición y el peso corporal, o la prevención de síndromes clínicos, tales como la obesidad o la diabetes, sino que se han establecido a lo largo de la evolución para incrementar la sobrevivencia y optimizar funciones

reproductivas. Una perspectiva biológica de este problema inicia con la observación de que las células gastan energía constantemente y requieren un continuo suplemento de combustibles para el metabolismo energético. La ingesta de alimento, el procesamiento de nutrientes y su transformación metabólica, son el resultado de una serie de adaptaciones que sustentan la fisiología de los organismos heterótrofos. Sin embargo, la disponibilidad de alimento y la demanda energética fluctúan en muchos hábitats, y la gran mayoría de los organismos no comen continuamente, por lo que las calorías necesarias dependen más de la efectividad en la obtención del alimento, y del momento estacional, entre muchas variables más. La ingesta de combustibles se canaliza a la oxidación celular o el almacenamiento en reservorios especiales en forma de glucógeno en el hígado y músculo, o en la forma de triacilglicéridos en el tejido adiposo.

Cuando el tracto digestivo está vacío, el cuerpo libera los nutrientes y combustible desde otros órganos (tejido adiposo, hígado). La habilidad de los organismos para monitorear la disponibilidad de energía interna y externa les permite priorizar sus opciones conductuales [32].

Entre los principales mensajeros químicos relacionados con la ingesta de nutrientes están los glucocorticoides (corticosterona/cortisol), y el neurotransmisor hipotalámico conocido como neuropéptido Y. El sistema de comunicación neuronal basado en el neuropéptido Y, que fue caracterizado inicialmente en el tracto intestinal [33], es activado en el núcleo arqueado y paraventricular por la falta del alimento y en coordinación con niveles elevados de glucocorticoides. En particular, el cortisol/corticosterona a bajas dosis potencia la ingestión de alimento, principalmente de carbohidratos, para recuperar la energía. También hay otras hormonas que estimulan la señal de hambre y la conducta de ingesta de alimento, como son: el glucagon, la ghrelina y la hormona de crecimiento. Por el contrario, las hormonas que favorecen el procesamiento de nutrientes son: la insulina, la leptina y la colecistoquinina. Naturalmente, la secreción de estas hormonas se efectúa en

respuesta a la disponibilidad de nutrientes, y sus niveles circulantes reflejan la disponibilidad de energía para todo el sistema en general. Por lo tanto, estas hormonas y otros péptidos liberados en la circulación promueven los ajustes conductuales y metabólicos apropiados para cualquier situación energética determinada [34].

Otro aspecto importante de la ingesta del alimento es la señal que determina el dejar de comer. Este aspecto es controlado en parte por un sistema sensorial que detecta la distensión mecánica del lumen estomacal o la contracción intestinal vía el nervio vago [35]. El llenado del estómago restringe la cantidad de alimento como una función de volumen, independiente del contenido nutritivo del mismo. Además, el número de comidas que se hagan por cada cierto tiempo determina la cantidad a ingerir de alimento cada vez que se coma. Esto está íntimamente relacionado por la oxidación de la glucosa y de los AGL, que sustentan la formación anaerobia y aerobia de ATP [36].

La disponibilidad de energía proveniente del metabolismo de glucosa y de lípidos está sujeta a regulación circadiana que sincroniza la ingesta y gasto de energía de acuerdo a los cambios diurnos en el ambiente externo. La ingesta de alimento y manejo de nutrientes es muy diferente en protocolos de horario restringido de alimentación (HRA) o acceso temporal al alimento. La ingesta de alimento se ve acelerada a tal punto que los animales bajo HRA ingieren una cantidad considerable de alimento (18-20 g), aunque no en la misma proporción que los animales con alimento *ad libitum* (AL) (25-30 g), pero en menor tiempo (sólo 2 h). Posteriormente, el vaciamiento gástrico y los niveles de leptina disminuyen lentamente, alrededor de 12 h [16]. Sin embargo, los animales alcanzan un nivel máximo de glucosa al finalizar las 2 h de acceso al alimento, disminuyendo súbitamente dentro las siguientes 3 h por la acción de la insulina al promover la captura de la misma por los demás órganos (tejido adiposo, músculo, hígado, cerebro, etc.). En las horas siguientes después de haber consumido alimento se observan los siguientes cambios: aumenta el nivel de insulina [17], se recuperan los niveles de triacilglicéridos hepáticos

[18], disminuyen las moléculas de ATP, el estado redox se reduce [30] y la triyotironina (T_3) aumenta [20]; la actividad de la glucógeno sintasa del hígado se eleva y favorece la conservación de los niveles de glucógeno. La leptina se incrementa después de 2 h de haber ingerido alimento (Figura 3).

Adaptaciones a la ingesta de alimento y procesamiento de nutrientes

Los mecanismos que sustentan la ingesta de alimento y el subsiguiente balance de energía no implican específicamente un punto de referencia como la composición y el peso corporal, o la prevención de síndromes clínicos, tales como la obesidad o la diabetes, sino que se han establecido a lo largo de la evolución para incrementar la sobrevivencia y optimizar funciones reproductivas. Una perspectiva biológica de este problema inicia con la observación de que las células gastan energía constantemente y requieren un continuo suplemento de combustibles para el metabolismo energético. La ingesta de alimento, el procesamiento de nutrientes y su transformación metabólica, son el resultado de una serie de adaptaciones que sustentan la fisiología de los organismos heterótrofos. Sin embargo, la disponibilidad de alimento y la demanda energética fluctúan en muchos hábitats, y la gran mayoría de los organismos no comen continuamente, por lo que las calorías necesarias dependen más de la efectividad en la obtención del alimento, y del momento estacional, entre muchas variables más. La ingesta de combustibles se canaliza a la oxidación celular o el almacenamiento en reservorios especiales en forma de glucógeno en el hígado y músculo, o en la forma de triacilglicéridos en el tejido adiposo. Cuando el tracto digestivo está vacío, el cuerpo libera los nutrientes y combustible desde otros órganos (tejido adiposo, hígado). La habilidad de los organismos para monitorear la disponibilidad de energía interna y externa les permite priorizar sus opciones conductuales [32].

Entre los principales mensajeros químicos relacionados con la ingesta de nutrientes están los glucocorticoides (corticosterona/cortisol), y el neurotransmisor hipotalámico conocido como neuropéptido Y. El sistema de comunicación neuronal basado en el neuropéptido Y, que fue caracterizado

inicialmente en el tracto intestinal [33], es activado en el núcleo arqueado y paraventricular por la falta del alimento y en coordinación con niveles elevados de glucocorticoides. En particular, el cortisol/corticosterona a bajas dosis potencia la ingestión de alimento, principalmente de carbohidratos, para recuperar la energía. También hay otras hormonas que estimulan la señal de hambre y la conducta de ingesta de alimento, como son: el glucagon, la ghrelina, la hormona de crecimiento. Por el contrario, las hormonas que favorecen el procesamiento de nutrientes son: la insulina, la leptina y la colecistoquinina. Naturalmente, la secreción de estas hormonas se efectúa en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, y sus niveles circulantes reflejan la disponibilidad de energía para todo el sistema en general. Por lo tanto, estas hormonas y otros péptidos liberados en la circulación promueven los ajustes conductuales y metabólicos apropiados para cualquier situación energética determinada [34].

Otro aspecto importante de la ingesta del alimento es la señal que determina el dejar de comer. Este aspecto es controlado en parte por un sistema sensorial que detecta la distensión mecánica del lumen estomacal o la contracción intestinal vía el nervio vago [35]. El llenado del estómago restringe la cantidad de alimento como una función de volumen, independiente del contenido nutritivo del mismo. Además, el número de comidas que se hagan por cada cierto tiempo determina la cantidad a ingerir de alimento cada vez que se coma. Esto está íntimamente relacionado por la oxidación de la glucosa y de los AGL, que sustentan la formación anaerobia y aerobia de ATP [36].

La disponibilidad de energía proveniente del metabolismo de glucosa y de lípidos está sujeta a regulación circadiana que sincroniza la ingesta y gasto de energía de acuerdo a los cambios diurnos en el ambiente externo. La ingesta de alimento y manejo de nutrientes es muy diferente en protocolos de horario restringido de alimentación (HRA) o acceso temporal al alimento. La ingesta de alimento se ve acelerada a tal punto de que los animales bajo HRA ingieren una cantidad considerable de alimento (18-20 g), aunque no en la

misma proporción que los animales con alimento *ad libitum* (AL) (25-30 g), pero en menor tiempo (sólo 2 h). Posteriormente, el vaciamiento gástrico y los niveles de leptina disminuyen lentamente, alrededor de 12 h [16]. Sin embargo, los animales alcanzan un nivel máximo de glucosa al finalizar las 2 h de acceso al alimento, disminuyendo súbitamente dentro las siguientes 3 h por la acción de la insulina al promover la captura de la misma por los demás órganos (tejido adiposo, músculo, hígado, cerebro, etc). En las horas siguientes después de haber consumido alimento se observan los siguientes cambios: aumenta el nivel de insulina [17], se recuperan los niveles de triacilglicéridos hepáticos [18], disminuyen las moléculas de ATP, el estado redox se reduce [30] y la triyotironina (T_3) aumenta [20]; la actividad de la glucógeno sintasa del hígado se eleva y favorece la conservación de los niveles de glucógeno. La leptina se incrementa después de 2 h de haber ingerido alimento (Figura 3).

En condiciones normales, la insulina es secretada posprandialmente de las células β pancreáticas en respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre y para regular procesos metabólicos como el aprovechamiento periférico de la glucosa, la síntesis de lípidos o la inhibición de la gluconeogénesis hepática. Además del papel ampliamente reconocido de la insulina a nivel periférico como hormona anabólica, existe también una acción ejercida a nivel cerebral con consecuencias directas en la homeostasis de la glucosa y en los procesos reproductivos [37].

Se ha visto que ratones con deficiencia del receptor de insulina en el cerebro, son obesos y tienen problemas de fertilidad, reforzando que el concepto de que la insulina en el cerebro no sólo regula el peso corporal, sino que también influye en el metabolismo de glucosa a nivel periférico.

La insulina se une a su receptor, que pertenece a la familia de los receptores de tirosincinasa, y se inicia una cascada de señalización en los tejidos blanco (cerebro y órganos periféricos) [38].

En roedores, la señalización de insulina en el sistema nervioso central es crítica para suprimir la producción de glucosa por el hígado. Esta acción depende de la señalización por la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y la activación de canales de potasio dependientes de ATP en el hipotálamo, específicamente en neuronas orexígenicas, además de la activación de la cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). En contraste, en perros, la acción de la insulina suprime la red de salida de glucosa hepática, disminuyendo la entrada de glucosa y la síntesis de glucógeno [39].

Se sabe que la insulina cuando accede al cerebro disminuye la ingesta de alimento y el peso corporal. Se propuso que la insulina sirve como una señal adipocítica en el cerebro que informa sobre la cantidad de grasa corporal y causa una respuesta metabólica de largo plazo, disminuyendo la ingesta de alimento e incrementando el gasto de energía. La insulina puede llegar al cerebro gracias a un transportador que atraviesa la barrera hematoencefálica cuando es secretada de manera aguda en respuesta al incremento de la concentración de glucosa en sangre. Los niveles de insulina en plasma correlacionan directamente con los niveles de tejido adiposo [39].

El control de la homeostasis energética por la insulina se ejerce principalmente por el núcleo arcuato del hipotálamo. Este núcleo integra las señales periféricas hormonales que reflejan el estado energético del cuerpo. Otra zona cerebral que es blanco de la insulina es el núcleo ventromedial, donde se ha visto que una infusión directa de insulina disminuye la ingesta de alimento y el peso corporal en ratas [38].

La insulina y la leptina, que es producida principalmente por adipocitos del tejido adiposo blanco, actúan en conjunto en neuronas dopaminérgicas modulando el sistema de recompensa del cerebro. La decisión de comer no sólo se sustenta en el estatus energético del organismo, sino también por los aspectos de recompensa y hedonísticos de la comida.

El aspecto de recompensa al consumir alimentos, contribuye significativamente al desarrollo de la obesidad, ya que la señalización en estos circuitos neuronales dopaminérgicos (núcleo acumbens, área tegmental ventral y sustancia nigra) puede sobrepasar la señalización hipotalámica. Ya se ha reportado que la restricción de alimento y el ayuno, estados en los cuales la insulina y la leptina están disminuidas, incrementan la necesidad de recompensa y reforzamiento de la misma forma como sucede con la adicción a las drogas [37].

El problema actual de la epidemia de obesidad que es una problemática mundial, también se relaciona con la señalización de insulina. Existen estudios en donde se ha visto que las dietas normo-calóricas, pero altas en grasa por periodos cortos, son suficientes para reducir de forma crónica la sensibilidad del hipotálamo por la insulina; lo que favorece a que haya un incremento del peso corporal, ya que se favorece el consumo inmoderado de comida (hiperfagia).

Los ácidos grasos pueden sensibilizar el hipotálamo, y entonces activar cascadas proinflamatorias, lo que trae como resultado resistencia a insulina y leptina a nivel central [39].

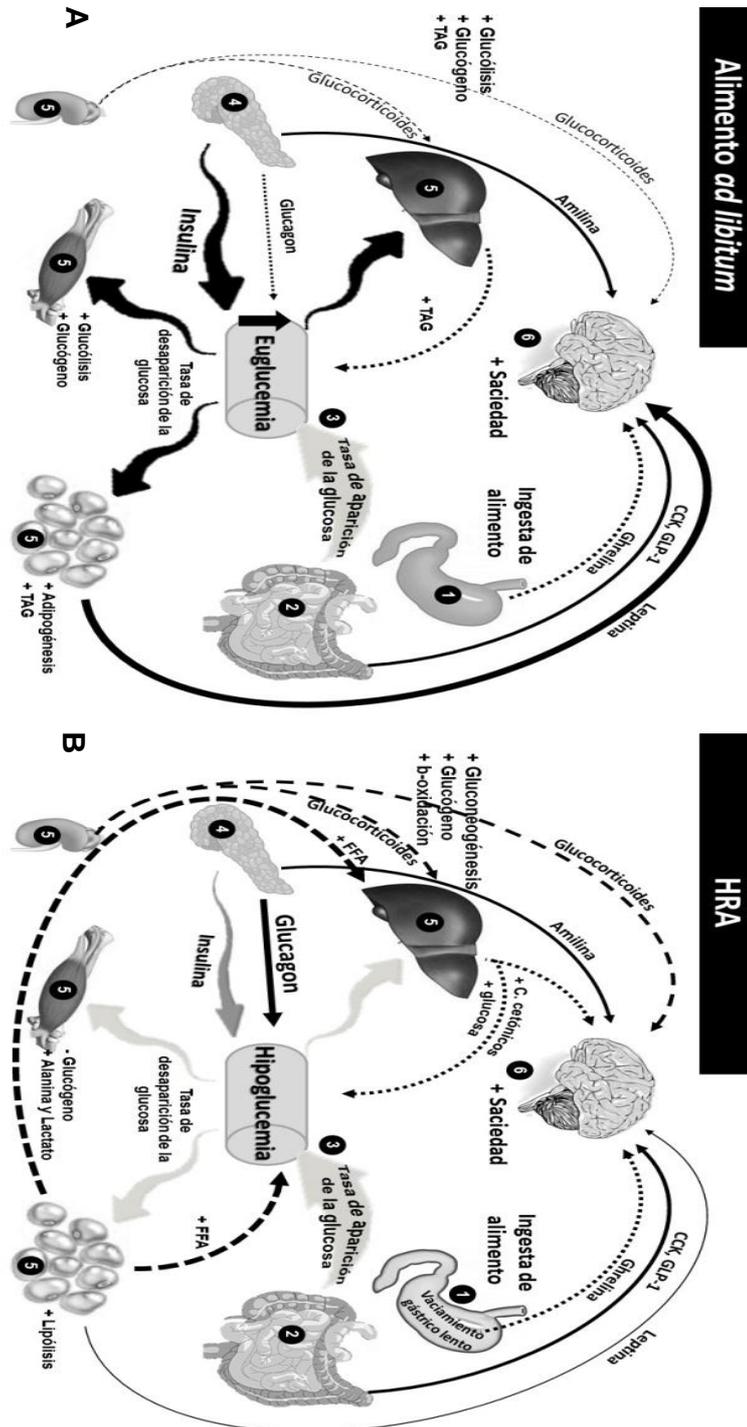


Figura 3.

Adaptaciones a la ingesta de alimento. A) Alimento *ad libitum*: al ingerir alimento el estómago llega a una distensión discreta, disminuyendo la liberación de ghrelina (1), seguida de un procesamiento y absorción de nutrientes en el intestino, aumentando la liberación de CCK y GLP-1 (2), favoreciendo el incremento de glucosa circulante (3), que a su vez estimula las células α del páncreas para disminuir la liberación de glucagón y las células β para estimular la liberación de insulina y amilina (4). La insulina, disminuye la glucosa circulante, por la captura de los órganos periféricos, estimulando glucólisis y glucogénesis (músculo); adipogénesis,

formación de TAG y liberación de leptina (tejido adiposo); glucólisis, glucogénesis y TAG (hígado) y disminuyendo la liberación de glucocorticoides (5). En combinación, estos parámetros favorecen la estimulación de centros de saciedad en el cerebro (6). B) Horario restringido de alimentación: la ingesta del alimento está limitada a 2h, lo que provoca una gran distensión gástrica, disminuyendo muy paulatinamente la ghrelina y con un vaciamiento gástrico lento de casi 18 h (1), con el procesamiento y absorción de nutrientes se libera CCK y GLP-1 (2), favoreciendo un incremento de la glucosa circulante, pero por efecto de la insulina disminuye rápidamente (3), manteniéndose los niveles elevados de glucagón y de amilina (4). El glucagón elevado fomenta que haya gasto de recursos energéticos (músculo) gluconeogénesis (formación de glucosa), glucogénesis y β -oxidación, liberando cuerpos cetónicos a la circulación (hígado), lipólisis y liberación de AGL y glicerol (tejido adiposo) y liberación aumentada de glucocorticoides (5). Favoreciendo la estimulación de centros de saciedad y el metabolismo de lípidos sobre el de carbohidratos (6).

Conclusión

El acceso al alimento en un horario restringido (2 h por día durante la fase luminosa) conlleva una adaptación multifuncional: a) Las variables fisiológicas que varían en función del estado de ayuno y alimentación adoptan un nuevo punto de control (set point); b) este control emergente implica la adquisición de una estrategia novedosa para regular la interacción entre las reacciones anabólicas y catabólicas, control que por su naturaleza se conoce como homeorrético, alostático o reostático, dependiendo la fuente consultada; c) el control reostático se ejerce sobre el proceso circadiano de ayuno-alimentación, por lo que influye en el funcionamiento del reloj molecular, teniendo como consecuencia una adaptación cíclica de frecuencia cercana a las 24 h. Este control reostático-circadiano se le ha denominado cronostasia.

Referencias

1. Bass, J. (2012) *Nature*. **491**, 348-356.
2. Stenvers, D.J., Jonkers, C.F., Fliers, E., Bisschop, P. y Kalsbeek, A. (2001) *Prog. Brain Res.* **199**, 359-376.
3. Challet, E. y Pévet, P. (2003) *Front. Biosci.* **8**, 246-257.
4. Aguilar-Roblero, R. y Díaz-Muñoz, M. (2010) *Sleep Biol. Rhythms.* **8**, 9-17.

5. Davidson, A.J. (2006) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1524-R1526.
6. Balsalobre, A. (2002) *Cell Tissue Res.* **309**, 193-199.
7. Glossop, N.R.J. y Hardin, P.E. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 3369-3377.
8. Blum, I.D., Lamont, E.W. y Abizaid, A. (2012) *Neurosci. Biobehav. Rev.* **36**, 254-270.
9. Mistlberger, R.E. (2011) *Physiol. Behav.* **104**, 535-545.
10. Mistlberger, R.E. (1994) *Neurosci. Biobehav. Rev.* **18**, 171-195.
11. Stephan, F.K. (1992) *Physiol. Behav.* **52**, 997-1008.
12. Landry, G.J., Simon, M.M., Webb, I.C. y Mistlberger, R.E. (2006) *Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1527-R153.
13. Davidson, A.J., Poole, A.S., Yamazaki, S. y Menaker, M. (2003) *Genes Brain Behav.* **2**, 32-39.
14. Shibata, S., Tahara, Y. y Hirao, A. (2010) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 918-927.
15. Escobar, C., Díaz-Muñoz, M., Encinas, F. y Aguilar-Roblero, R. (1998) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **274**, R1309-R1316.
16. Martínez-Merlos, M.T., Ángeles-Catellanos, M., Díaz-Muñoz, M., Aguilar-Roblero, R., Mendoza, J. y Escobar, C. (2004) *J. Endocrinol.* **181**, 53-63.
17. Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Aguilar-Roblero, R. y Escobar, C. (2000) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**, R48-R56.
18. Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Báez-Ruiz, A., Martínez-Cabrera, G., Soto-Abraham, M.V., Avila-Casado, M.C. y Larriva-Shad, J. (2010) *Comp. Hepatol.* **23**, 9.
19. Rivera-Zavala, J., Báez-Ruiz, A. y Díaz-Muñoz, M. (2011) *PPAR Res.* 2011, 261584.
20. Aceves, C., Escobar, C., Rojas-Huidobro, R., Vázquez-Martínez, O., Martínez-Merlos, T., Aguilar-Roblero, R. y Díaz-Muñoz, M. (2003) *J. Endocrinol.* **179**, 91-96.
21. Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M. y Shibata, S. (2001) *Genes Cells.* **6**, 268-279.
22. Kerndt, P. R., Naughton, M. D., Driscoll, C. E. y Loxterkamp D. A. (1982) *Western J. Med.* **170**, 379-399.
23. Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B. y Want, L. (2004) *Diabetes Spec.* **17**, 183-190.
24. Macfarlane, D. P., Forbes, S. y Walker, B. R. (2008) *J. Endocrinol.* **197**, 189-204.
25. Azzout, B., Bois-Joyeux, B., Chanez, M. y Peret, J. (1987) *J. Nutr.* **117**, 164-169.
26. Katz, J. y Tayek, J. A. (1998) *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **275**, E537-E542.
27. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L. (2002) *Biochemistry*. 5th edition. New York: WH Freeman.
28. Vaughan, M., Berger, J. E y Steinberg, D. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 401-409.
29. Oliver, O. E. (2005) *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **33**, 246 -251.

30. Báez-Ruiz, A., Escobar, C., Aguilar-Roblero, R., Vázquez-Martínez, O. y Díaz-Muñoz, M. (2005) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, G1015-G1023.
31. Luna-Moreno, D., García-Ayala, B. y Díaz-Muñoz, M. (2012) *Brit. J. Nutr.* **108**, 2002–2013.
32. Schneider, J.E. y Watts, A.G. (2002) *Hormon. Brain Behav.* 1st. Ed. Elsevier Inc. Academic Press.
33. Gray, T.S., O'Donohue, T.L., and Magnuson, D.J. (1986) *Peptides* **7**, 341-349.
34. Broberger, C. y Hökfelt, T. (2001) *Physiol. Behav.* **74**, 669-682.
35. Schwartz, G.J. (2000) *Nutrition.* **16**, 866-873.
36. Friedman, M.I., Horn, C.C. y Ji, H. (2005). *Chem. Senses* **30**, i182-i183.
37. Williamson, R., McNeilly, A. y Sutherland, C. (2012) *Biochem. Pharmacol.* **84**, 737-745.
38. Konner, A.C., Klockener, T. y Bruning, J.C. (2009) *Physiol. Behav.* **97**, 632-638.
39. Vogt, M.C. y Bruning, J.C. (2012) *Trend. Endocrinol. Metab.* **849**, 1-9.

Semblanza del Dr. Mauricio Muñoz Díaz



Estudió Biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM. La Maestría y Doctorado los realizó en el Instituto de Fisiología Celular en el programa de Investigación Biomédica Básica. Después de 2 estancias posdoctorales (en Baylor College, Houston, TX y en UCSD, San Diego, CA) se incorporó como investigador al Instituto de Fisiología

Celular, para después cambiar su adscripción al Instituto de Neurobiología en el campus UNAM-Juriquilla en Querétaro. Actualmente es Investigador Titular C y nivel III del SNI.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 69-108, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.
(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

MECANISMOS DE DAÑO Y NEUROPROTECCIÓN EN LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL

NEUROPROTECTION AND DAMAGE MECHANISMS IN TRAUMATIC INJURY SPINAL CORD

Araceli Díaz Ruiz

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

Resumen

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es un padecimiento de consecuencias devastadoras que genera daño irreversible sobre la función neurológica. La mayor incidencia se presenta en personas jóvenes afectando principalmente a los varones en una relación 4:1 con respecto a las mujeres. Es considerado un problema de salud pública, con alteraciones económicas y psicológicas tanto para el paciente como para sus familiares. Para su tratamiento, se requiere de un grupo multidisciplinario (médicos traumatólogos, neurólogos, neurocirujanos, personal de rehabilitación y psicólogos) lo que genera altos costos para los centros de salud, que destinan anualmente varios cientos de miles de pesos para la atención de estos pacientes y a pesar de estos esfuerzos, no se logra revertir el daño y como consecuencia la mayoría de los pacientes no logran reintegrarse de forma independiente a sus actividades productivas previas. En la actualidad existen diversos grupos de investigación interesados en desarrollar estrategias neuroprotectoras eficaces que logre restablecer la función neurológica perdida, los resultados a este respecto han sido poco alentadores. A pesar de las

investigaciones clínicas y experimentales para desarrollar fármacos neuroprotectores, no se cuenta con ninguna opción de tratamiento eficaz. La falta de éxito se debe principalmente, a la complicada organización y función del tejido nervioso de la médula espinal, así como a la ausencia de regeneración y proliferación que son característicos del tejido nervioso, además la fisiopatología de la lesión es muy compleja y se requiere de un gran número de investigaciones para tratar de entender la dinámica y participación de los mecanismos de daño secundarios presentes en cada etapa después de producirse una LTME. Se han propuesto cuatro principales eventos autodestructivos que se observan en la etapa aguda de la lesión que tienen un papel importante y son: la excitotoxicidad, el estrés oxidante, la respuesta inflamatoria y la muerte celular por apoptosis. Con base en esta información, el objetivo de la presente revisión es recopilar información de los principales mecanismos de daño secundario que se activan durante la etapa aguda después de ocurrida una LTME y que son claves para establecer blancos terapéuticos eficaces. Finalmente se analizan los estudios clínicos, que han aportado los más sobresalientes resultados, con el uso de terapias farmacológicas neuroprotectoras.

Palabras clave: Lesión traumática de la médula espinal, fisiopatología, excitotoxicidad, estrés oxidante, inflamación, apoptosis.

Summary

Traumatic spinal cord injury (TSCI) is a devastating disease resulting in an irreversible damage to neurological function. The highest incidence occurs in young people affecting males in a ratio of 4 to 1 with respect to women. It is considered a public health problem, with economic and psychological sequels for both the patients and their family. For treatment, it requires a multidisciplinary group (trauma physicians, neurologists, neurosurgeons, rehabilitation personnel and psychologists), that generates high costs for health centers, that annually spend several hundred thousand dollars for the patients' care. Despite these efforts to prevent the damage, most patients fail to independently reintegrate to their previous productive activities. Currently, there are several research groups interested in developing effective neuroprotective strategies to achieve a restoration of the lost neurological function. However, the results in this regard have been very encouraging recently. Although experimental and clinical research to develop neuroprotective drugs, have been developed, we still lack an effective treatment option. The lack of success is mainly due to the complicated organization and function of the nervous tissue of the spinal cord, as well as the absence of regeneration and proliferation which are characteristic of the nervous tissue, and the pathophysiology of injury that is very complex and requires sustained research effort to understand the dynamics and participation of secondary damage mechanisms present in each stage after TSCI. It has been suggested four major destructive events occurring in the acute phase of the injury that play an important role and those include: excitotoxicity, oxidative stress, inflammatory response and cell death by apoptosis. Based on this information, the aim of this review is to

gather information from key secondary injury mechanisms that are activated during the early stage occurring after TSCI that are key to establishing effective therapeutic targets. Finally, we analyze the clinical studies, which have provided the most outstanding results, with the use of neuroprotective pharmacological therapies.

Keywords: Traumatic spinal cord injury, pathophysiology, excitotoxicity, oxidante stress, inflammation, apoptosis.

INTRODUCCIÓN

Epidemiología

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es un padecimiento incapacitante, sin cura y sin opción de tratamiento eficaz. La prevalencia mundial reportada para este padecimiento es incompleta, sin embargo se estima que existen entre 236 y 1009 casos por cada millón de habitantes. Los datos de la incidencia se reportan con mayor precisión solo en algunas regiones como: América del Norte (39 millones), Europa Occidental (15 millones) y Oceanía (16 por cada millón). La principal causa de las lesiones en estas regiones es por accidentes automovilísticos, mientras que en el sureste asiático, predomina los percances en vehículos de dos ruedas, en Asia meridional y Oceanía las caídas de altura son las que predominan, lo mismo ocurre en Japón y Europa Occidental, mientras que la violencia (principalmente con armas de fuego) fue mayor en América del Norte (15%) que en Europa Occidental (6%) o Australia (2%).

Por otra parte en África Sub-Sahariana, se ha reportado que la mayoría de las lesiones de la medula espinal son ocasionadas por actos violentos y representa la tasa más alta del mundo (38%). Las Altas incidencias también se reportan en el norte de África, Oriente Medio (24%) y América Latina (22%). Los países desarrollados han mejorado significativamente la sobrevida de los pacientes con LTME en comparación con los países de desarrollo, en particular para la tetraplejia. Los países de desarrollo tienen la mayor tasa de mortalidad dentro del primer año después de ocurrido el trauma. Mientras que en los países

de África subsahariana es probable que sea una enfermedad mortal después de presentarse la lesión de la columna [1].

De acuerdo con un estudio reciente publicado en el 2012 por Oliver y col., en el que analizaron la incidencia de traumatismos medulares en E.U. en un periodo de 13 años observaron que la mayor incidencia se presenta en una edad promedio de 37.7 ± 17.4 años, los reportes de acuerdo con la edad fueron: de 0-2 años 0.5% (12/2562); de 3-8, 0.4% (10/2562); de 9-15, 2.0% (52/2562), de 16-55, 81.9% (2098/2562) de 56-75, 10.8% (277/2562) y de > 76 años 4.4% (112/2562), de estos casos se observó que el 75.3% fueron varones (1929/2562). Así mismo, se observó que las lesiones fueron, 32% por accidentes automovilísticos, 21.2% por caídas, 16.4% personas arrojadas por automóviles o motocicletas, 14.1% por heridas punzocortantes y armas de fuego y el 16.3% por otras causas. Sin embargo la incidencia y las causas de los traumatismos medulares son distintas con respecto a cada país, por ejemplo en Francia se reportan 1,500 nuevos casos al año con una edad promedio de 33 años con una relación de 3.5:1 hombres/mujeres [2].

Ning y col., [3] reportaron que en Asia la incidencia anual es de 12.06 a 61.6 nuevos casos por cada millón de habitantes y la edad promedio se observó desde 26.8 a 56.6 años, siendo los hombres los de mayor riesgo. La causa principal de los traumatismos medulares son las colisiones en vehículo y caídas de altura. Sin embargo, varios países informaron que las heridas de guerra fueron la causa principal. Finalmente en este estudio concluyen que la epidemiología de Asia es diferente de la de otras regiones, por lo que las medidas de intervención deben establecerse de acuerdo con las características específicas de la población.

Datos epidemiológicos en México

De acuerdo con los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) del XII Censo General de Población y Vivienda, realizado en el año 2000, reportaron 8 personas con discapacidad motora por cada 1,000 habitantes lo que representa poco más de 814,000 personas con esta condición, de las cuales 76.2% viven en localidades urbanas y 23.8% en el medio rural. Los estados con mayor prevalencia son: Yucatán y Durango con 11.9 y 11.3 personas por cada mil habitantes, respectivamente; seguidas de Colima y Zacatecas. Mientras que, Chiapas (5.1), Quintana Roo (5.3) y Tlaxcala (5.9) fueron las entidades con la menor prevalencia en el país (INEGI, 2004). En 1998, se reportó que las lesiones medulares se presentan en una relación de 6:1 hombres/mujeres con un pico máximo de edad de 30.1 años para ambos géneros así mismo se pudo establecer que los hombres tienen 2.1 veces más riesgo de sufrir accidentes automovilísticos con respecto a las mujeres y 1.3 veces más riesgo tener un accidente por caídas de altura, mientras que para las mujeres existe mayor riesgo de lesiones de la médula espinal por proyectil de arma de fuego.

Otro dato interesante es que las personas con bajo nivel socio-económico y baja escolaridad resultaron ser los más vulnerables. Así mismo, se encontró una relación estadísticamente significativa entre la ocupación y la causa de la lesión, ya que la población que desempeña un trabajo intelectual tiene 2.6 veces más riesgo de sufrir lesión medular por accidente automovilístico y las personas que realizan trabajos físico tienen 2.7 veces más riesgo de sufrir una caída de altura [4]. En un reporte realizado en el 2008 en el Centro Nacional de Rehabilitación de la Ciudad de México, mostró que la efectación tuvo una relación de 3.2:1 hombres/mujeres, con una edad promedio de 33 años, del total de lesionados el 46% fueron solteros, con actividad laboral en la construcción, seguidos de profesionistas y en menor proporción gente desempleada y amas de casa. Las lesiones a nivel torácico fueron las más frecuentes, finalmente se encontró una

correlación importante entre la ingesta de alcohol y la violencia como factores que contribuyen a que las lesiones de la médula espinal ocurran [4].

Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal.

La fisiopatología de la LTME implica la activación de una serie de mecanismos autodestructivos que tienen una dinámica muy compleja y que es importante conocer para analizar su importancia y poder establecer blancos terapéuticos eficaces. Los modelos animales son ampliamente utilizados para satisfacer este fin y resultan ser una herramienta muy valiosa para el avance de este conocimiento. Para entender mejor la dinámica de la lesión, ésta se ha dividido en dos grandes etapas de acuerdo con los acontecimientos a lo largo del tiempo: la lesión primaria; es el daño mecánico inicial que puede producirse por compresión, contusión o dislocación y cuya intensidad puede variar dependiendo de las características de este evento (Figura 1) y la lesión secundaria; son todos los mecanismos bioquímicos y moleculares que se alteran como consecuencia de la lesión primaria.

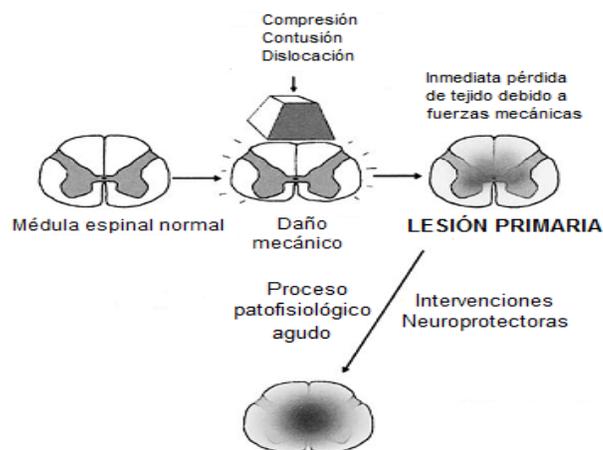


Figura 1. Lesión primaria y daño secundario posteriores a una lesión traumática de la médula espinal. Las fuerzas mecánicas al momento de la lesión son el detonante para que una serie de mecanismos auto-destructivos lleven a la pérdida del tejido adyacente al sitio de la lesión que es altamente vulnerable a sufrir daño irreversible, este evento es el que se denomina lesión secundaria y a estos eventos agudos de daño están dirigidas las terapias neuroprotectoras. (Modificado de Kwon y cols., 2004) [5].

Alteraciones vasculares e isquemia

Uno de los primeros eventos de daño observados durante la etapa aguda son las alteraciones vasculares que se presentan desde el inicio de la lesión y dentro de las primeras 2 hr posteriores del daño. En esta etapa se presenta la ruptura de los vasos sanguíneos y de la barrera hemato-encefálica, por lo que el tejido hematopoyético es vertido en el tejido nervioso [6]. Seis horas después se presenta edema en la sustancia blanca que rodea al sitio de lesión [7], la hemorragia se expande entre las 12 y 24 h posteriores al daño en el tejido adyacente, la sustancia blanca y gris pierde su definición volviéndose inconsistente debido al aumento del edema [6]. Como consecuencia de estas alteraciones en el endotelio vascular se presenta vasoconstricción durante tres días, para finalmente desaparecer al octavo día de ocurrida la lesión (figura 2).

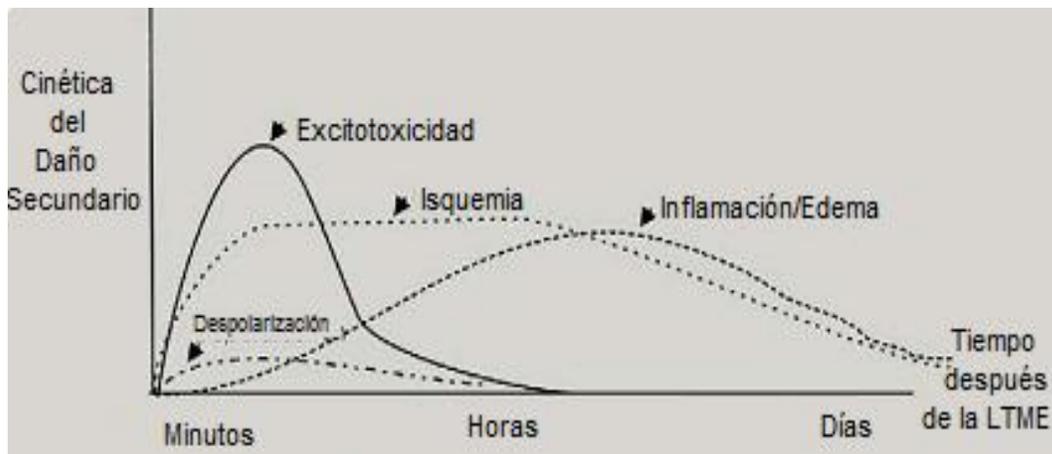


Figura 2. Cinética del daño secundario. En la imagen se muestran los eventos auto-destructivos a lo largo del tiempo a partir del daño mecánico inicial, como podemos observar se presenta una despolarización de la membrana plasmática por la falla energética, así como por la pérdida de la integridad de la membrana celular, este evento lleva a la liberación del glutamato que al unirse a sus receptores lleva al inicio de la excitotoxicidad. Este evento incrementa el calcio intracelular activando enzimas dependientes de Ca^{++} , generando falla mitocondrial y favorecer la producción de radicales libres produciendo en la célula un estado de estrés oxidante. Los mecanismos que inician la inflamación, también son activados por Ca^{++} así como la liberación del citocromo-C para dar inicio a la cascada apoptótica (modificado de Schwab y cols., 2006) [8].

Los altos requerimientos metabólicos de las neuronas, hacen que la sustancia gris sea extremadamente sensible al daño por isquemia, éste último puede estar acompañado de la pérdida de los mecanismos de auto-regulación que normalmente proveen de un estricto control de la hemodinámica a la microvasculatura dentro de la médula espinal. La muerte celular se extiende preferentemente en dirección vertical a través de la sustancia gris mientras que el edema se extiende transversalmente a través de la sustancia blanca [5].

En esta etapa de daño vascular y hemorragia, una enzima que tiene una participación importante es la hemo-oxigenasa (HO) con base en esto, nuestro grupo exploró su participación después de la lesión. Se sabe que la HO es una enzima que se induce por estrés, cataliza la oxidación del grupo hemo a biliverdina y monóxido de carbono (CO), con la liberación de fierro, sus productos tienen efectos biológicos ya que la biliverdina es antioxidante y el CO tiene capacidad para regular el GMPc y favorecer la vasodilatación. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la participación de la HO después de una LTME, nosotros utilizamos ratas Wistar, hembras de 200 a 250 gr a las que se les practicó una lesión, posteriormente los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos (2, 4, 8, 12 y 24 h) después del daño para evaluar la actividad de la HO por espectrofotometría visible. Los resultados mostraron un incremento de la actividad de la HO a las 4 y 24 h, mientras que a las 2 y 12 h no se observaron cambios. Estos resultados nos permiten entender que la participación de la HO es diferencial. Tomando en consideración estos hallazgos diseñamos un segundo estudio utilizando activadores e inhibidores de la enzima. Para esto se trató con Tin-protoporfirina IX (un inhibidor de la HO) y Hemina (un activador de la HO), ambos grupos se compararon con el grupo control (LTME y vehículo) se realizó una evaluación funcional cada semana durante dos meses y los resultados demostraron una mayor recuperación funcional en los animales tratados con Hemina, en comparación al grupo tratado con inhibidor y al control, lo que sugiere que las estrategias encaminadas a incrementar la actividad de la HO pueden ser utilizadas como un buen blanco terapéutico [9].

Excitotoxicidad

El segundo evento de daño secundario que ocurre de forma temprana es la excitotoxicidad. La liberación y acumulación de glutamato (Glu) y ácido kaínico (AK) ocurre rápidamente después de una lesión medular en respuesta al proceso isquémico y a la despolarización de la membrana celular, durante este proceso se alcanzan niveles tóxicos de estos neurotransmisores en tan solo 15 min después de la lesión [10]. El Glu es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el sistema nervioso central (SNC), actúa sobre 2 tipos de receptores, el N-metil-D-aspartato (NMDA) y el Amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol propionato (AMPA). El término excitotoxicidad se refiere a la sobre activación de los receptores por efecto del Glu y del AK que llevan al incremento del Ca^{2+} intracelular y al inicio de una cascada de eventos deletéreos dependientes de Ca^{2+} [5, 8]. Asimismo, la activación de los receptores NMDA y AMPA también liberan Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (retículo endoplásmico), ocasionando un incremento dentro del citosol y la mitocondria. Este aumento del ión, altera el metabolismo celular generando disfunción mitocondrial, falla del metabolismo energético aerobio, producción de óxido nítrico por la activación de la sintasa del óxido nítrico (SON) constitutiva que es dependiente de Ca^{2+} , además de enzimas como las calpaínas, proteasas, endonucleasas, ATPasas, fosfolipasa A_2 y lipooxigenasas que degradan la membrana plasmática, el núcleo y los componentes del citoesqueleto [5, 6, 11].

Además, del incremento intracelular de Ca^{2+} , existe un aumento de Na^+ y Cl^- , que junto con la salida de K^+ llevan a la muerte celular por excitotoxicidad, siendo los oligodendrocitos los más vulnerables [2, 8]. Estos desequilibrios influyen en la despolarización masiva de la membrana y la pérdida del ATP (Figura 3). El Glu y el Ca^{2+} liberados también contribuyen a la muerte de las células neuronales y gliales vecinas. La generación de radicales libres, y la desregulación

de la fosforilación oxidativa mitocondrial conduce a la muerte apoptótica celular [5, 6].

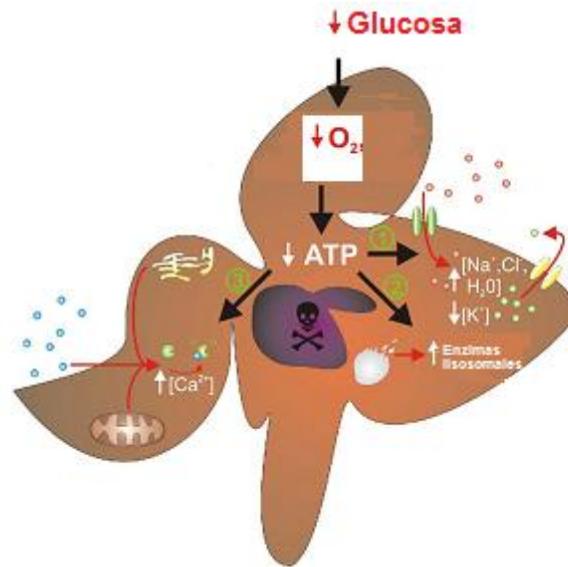


Figura 3. Mecanismos falla energética y baja síntesis de ATP en las células nerviosas de la médula espinal después de una LTME. La cascada de muerte celular está mediada a través de 3 mecanismos: 1) pérdida de la permeabilidad de la membrana, 2) liberación del contenido lisosomal intracelularmente iniciando autofagia y 3) el incremento en los niveles de calcio intracelular genera la activación de proteasas dependientes de calcio (Modificado de Profyris y cols., 2004[12]).

El estrés oxidante puede, además, inhibir a enzimas clave de la cadena respiratoria, alterar el ADN y sus proteínas asociadas, inhibir la ATPsintasa de Na⁺/K⁺, e inducir un colapso metabólico con la subsecuente muerte necrótica o apoptótica de la célula [13]. Tomando en consideración que después de una LTME se producen alteraciones en el metabolismo energético que pueden llevar a cambios en la cantidad de Asp y de Glu (involucrados en la neurotransmisión excitatoria) así como del precursor de la síntesis de Glu y de GABA (glutamina), nuestro grupo cuantificó en la etapa aguda de la lesión la cantidad de estos aminoácidos, así como la cantidad de Gly (neurotransmisor inhibitorio) presentes en el sitio del daño. La taurina (un osmolito involucrado en el edema) y las concentraciones de citrulina (aminoácido que se produce como resultado de la

actividad de la SON), también fueron analizados. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratas con y sin lesión los cuales fueron sacrificadas a diferentes tiempos (2, 4, 8, y 12 h) después del procedimiento quirúrgico, el tejido se procesó y fue analizado por el método HPLC. Los resultados mostraron que tanto el contenido de Glu como el de Asp disminuyeron por efecto de la lesión, mientras que la concentración de Gln se incrementó. Sin embargo, la suma de la concentración molar de Glu más Gln permaneció sin cambios en todos los tiempos evaluados. La concentración de GABA aumentó en comparación con el grupo control, mientras que la Gly permaneció sin cambios. Finalmente, los niveles de citrulina aumentaron por efecto de la LTME, mientras la taurina aumentó sólo a las 4 h después de la lesión. Los resultados indican que existen cambios complejos en la cantidad de neurotransmisores durante la fase aguda después de una LTME, así mismo se pudo concluir que las concentración de Glu y Asp, no incrementan durante la etapa aguda en los tiempos estudiados, resulta interesante ya que estos hallazgos pueden explicar porque los fármacos neuroprotectores dirigidos a inhibir la excitotoxicidad no tienen relevancia terapéutica, debido a que este evento se desencadena en etapas muy tempranas (antes de las 2 h) [14].

Estrés oxidante asociado al trauma medular

En la mitocondria se lleva a cabo la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa, en este proceso, el oxígeno (O_2) es reducido hasta H_2O . El O_2 acepta electrones uno a la vez, en un evento secuencial, generando anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$) y agua. En condiciones fisiológicas la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) es probablemente menor al 5%, sin embargo esta producción puede incrementarse, cuando la concentración de Ca^{2+} o Na^+ aumentan súbitamente como respuesta a un evento excitotóxico, un exceso en $O_2^{\cdot-}$ puede provocar la formación de muchas otras especies reactivas, incluyendo $\cdot OH$ y radicales libres (RL) de peroxihidroxilo ($OH_2\cdot$). A pH fisiológico el $O_2^{\cdot-}$ tiende a dismutarse formando H_2O_2 y oxígeno, a través de las diversas isoformas de la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 , es

detoxificado, por la catalasa, enzima que se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas, así como también por la glutatión peroxidasa citosólica.

El H_2O_2 no es un radical libre pero fácilmente difunde a través de las membranas biológicas con un diámetro semejante al $O_2^{\cdot-}$, así estos pueden generar un daño citotóxico en sitios distantes de su generación, la reacción entre estas dos moléculas se ha descrito como la reacción de Haber-Weiss, proceso que favorece la producción del radical $\cdot OH$, altamente reactivo, cuando el H_2O_2 se encuentra en presencia de metales de transición como fierro y cobre, se generan altas concentraciones de $\cdot OH$, por la reacción de Fenton [15]. Sin embargo no todos los metales se encuentran libres, existen algunos unidos a proteínas, como el fierro que se une a la ferritina, en esta forma el fierro no cataliza la reacción para formar RL.

El radical $\cdot OH$ es considerado el más potente oxidante en los sistemas biológicos, por su alta reactividad el $\cdot OH$ tiene una vida media corta, y como consecuencia es limitada su capacidad de difusión (aproximadamente 0.01 del diámetro de la proteína), la metalotioneína, es considerada una proteína de defensa antioxidante, es intracelular de bajo peso molecular que consta de 61 a 62 residuos de aminoácidos no aromáticos, con gran contenido de cisteínas (25-30%), no forman puentes disulfuro y tiene alta afinidad por los metales, se encuentran unidos de 5-7 átomos de zinc, 12 de cobre o 7 átomos de cadmio por mol de proteína [16, 17]), también se ha demostrado que el ácido salicílico es un potente atrapador de radicales $\cdot OH$ [18], así como el α -tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico que reaccionan directamente con el radical $\cdot OH$ para formar productos más estables. Se sabe que el α -tocoferol previene el daño oxidante de los ácidos grasos poliinsaturados y de las proteínas con alto contenido de grupos tioles que se encuentran en las membranas [19] mientras que el ascorbato es un atrapador hidrosoluble requerido como cofactor de varias hidroxilasas [20]; más

aún, el ascorbato y el α -tocoferol pueden actuar sinérgicamente inhibiendo las reacciones de oxidación.

Finalmente se ha reportado que el óxido nítrico (NO) y algunos donadores de NO que tienen nitroglicerina pueden suprimir la generación de $\cdot\text{OH}$, *in vivo* e *in vitro* [21], además indirectamente la acción de la SOD, peroxidasas y catalasas previenen la formación del radical $\cdot\text{OH}$.

Moléculas blanco de los radicales libres.

La lipoperoxidación de las membranas celulares puede iniciarse al estar en contacto con el radical $\cdot\text{OH}$, que tiene la capacidad de sustraer un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados. El radical carbono (sin hidrógeno) puede reaccionar con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar el radical peroxilo, y este a su vez puede sustraer un átomo de hidrógeno del ácido graso adyacente para formar hidroperóxidos de lípidos y así de esta manera dar inicio a una reacción en cadena, causando alteraciones en la fluidez e integridad de las membranas permitiendo la salida de los iones y originar la pérdida del potencial de membrana [19]. Las ERO, también pueden oxidar diversas proteínas alterando su estructura, con este proceso se inactivan diversas enzimas, receptores y proteínas estructurales. Dicha oxidación puede estar involucrada con la regulación y función de los receptores [22]; además, las proteínas que han sido modificadas por oxidación son más susceptibles a la degradación por proteasas [23].

La ruptura de las hebras sencillas o dobles del DNA, el entrecruzamiento de DNA-DNA y DNA-proteínas así como la modificación de bases puede ocurrir como consecuencia del ataque de los RL [24]. De las cuatro diferentes bases nitrogenadas del ADN, la timina es la más susceptible de sufrir oxidación, en la etapa temprana de daño al DNA, se activan varios procesos de reparación, que incluyen a la poli (ADP-ribosa) sintetasa (PARS). Esta enzima transfiere monómeros de ADP-ribosa del NAD^+ a las proteínas asociadas a la cromatina o a

otras moléculas de ADP-ribosa para formar polímeros. Una gran cantidad de proteínas tal como la topoisomerasa, la DNA y la RNA polimerasas, la DNA ligasa y la endonucleasa pueden ser poli-ADP ribosiladas [25]. La activación de PARS bajo condiciones de extenso daño al DNA puede causar una rápida disminución del NAD^+ intracelular, lo cual genera un alto consumo de ATP, pues se sabe que, por cada molécula de NAD^+ regenerada se consume una molécula de ATP. Una vez que la PARS está presente en grandes cantidades en el núcleo, se unen muchas unidades de ADP-ribosil a las proteínas nucleares, esta activación puede llevar a una rápida disminución en los depósitos de energía. Se ha observado en cultivos de células neuronales un incremento de la activación de PARS al administrar dosis tóxicas de Glu o en presencia de donadores de NO [26, 27]. Así, la ADP-ribosilación desencadenada a través de la fragmentación del DNA durante el estrés oxidante y la activación de PARS puede llevar a una severa baja energética y a la muerte celular [28].

Fuentes enzimáticas de generación de radicales libres.

La xantina deshidrogenasa (XD) se encuentra localizada principalmente en el endotelio de los vasos sanguíneos en el cerebro [29], esta enzima cataliza la oxidación secuencial de hipoxantina - xantina - ácido úrico. La XD, transfiere electrones de su substrato a la NAD^+ , y así de esta forma no se producen radicales libres, pero la XD puede ser convertida a la forma oxidasa (XO) de manera irreversible por una proteólisis limitada o de manera reversible por una oxidación química o enzimática de grupos tioles [30] y producir O_2^- por transferencia de electrones directamente al oxígeno. En diversos eventos como la hipoxia [31], la isquemia-reperfusión [32] y la excitotoxicidad, se promueve la conversión de XD a XO. El uso de antagonistas de XO ha demostrado tener efecto neuroprotector en modelos de excitotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, así mismo se sabe que los inhibidores de XO son capaces de suprimir la generación de RL en un modelo de isquemia cerebral en ratas [33]. Durante el proceso de daño se libera ácido araquidónico (AA) esterificado a través del rompimiento de las

membranas lipídicas por la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2). Una vez que es liberado el AA ejerce diversas acciones biológicas, incluyendo la modulación de la liberación y recaptura de los neurotransmisores así como la modulación de la actividad de canales iónicos y proteínas cinasas. El AA sirve como precursor de eicosanoides, ya que este es metabolizado por la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa y la citocromo P-450 oxigenasa (epooxigenasa), para formar prostaglandinas, leucotrienos y epóxidos respectivamente. Las tres enzimas producen $O_2^{\cdot-}$ como producto de su actividad.

Durante varias condiciones patológicas en el sistema nervioso, se ha considerado que al activarse la PLA2 por el incremento de Ca^{2+} intracelular, es una importante vía de generación de RL y de la inflamación [34, 35], esta vía es explorada mediante el uso de fármacos que antagonizan el efecto neurotóxico del Glu [36]. Finalmente otra fuente de generación de radicales libres es la activación de la sintasa de óxido nítrico (SON). Tomando en cuenta estos antecedentes, desde 1999 estamos dedicados a caracterizar el daño oxidante en la etapa aguda de la LTME, nuestro grupo demostró que existe daño oxidante después de la lesión, el cual fue evaluado por medio de la lipoperoxidación, se observó el pico máximo se presenta a las 24 h después del evento traumático [37], en este mismo estudio se observó que el tratamiento con ciclosporina-A antagoniza dicho evento en animales con LTME al compararse con el grupo control, además se demostró que el tratamiento promueve una mayor recuperación funcional en los animales. Posteriormente en el 2000 probamos que la administración de ciclosporina-A y metilprednisolona ya sea en forma independiente o combinados también favorecen la recuperación funcional [38]. Otra de las vías de generación de RL que se caracterizó fue la síntesis de NO por la activación de las isoformas constitutivas SON-neuronal y SON-endotelial (dependientes de Ca^{2+}) así como la SON-inducible que se expresa en condiciones de daño. Los resultados mostraron un incremento de la actividad de la SON constitutiva a las 4 y 8 h después de la lesión, mientras que la SON inducible se observó hasta las 72 h [39, 40, 41],

asimismo en el 2004 y 2005 demostramos que la ciclosporina-A inhibe la expresión y la actividad de las tres isoformas de la SON [40, 41].

La participación de las defensas anti-oxidantes durante la etapa aguda del daño también ha sido objeto de estudio para nosotros, para ello caracterizamos los cambios en el contenido de metalotioneína (MT), de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) así como la glutatión peroxidasa (GPx) durante la etapa aguda después de una LTME, los resultados mostraron un incremento en la cantidad de MT por efecto del trauma, sólo en 4 y 24 h, en comparación con los valores presentes en el tejido sano, también se observó una disminución en la cantidad de GSH a 4, 12 y 24 horas después de la LTME. Curiosamente, la actividad GPx se incrementó en todos los tiempos evaluados, lo que indica que esta defensa enzimática se activa inmediatamente después del daño [42]. Recientemente probamos el efecto neuroprotector de la MT administrada de forma exógena después de una LTME, los resultados mostraron mayor recuperación funcional y menor destrucción del tejido nervioso en el epicentro de la lesión en los animales que recibieron el tratamiento, en comparación al grupo control [43].

Lesión traumática de la médula espinal e inflamación.

Después de producirse una LTME se inicia una respuesta inflamatoria, que se caracteriza por la producción de diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias sintetizadas por las células endoteliales [44], asimismo, estas células incrementan la expresión de diversas moléculas de adhesión, como las selectinas, las ICAM-1 y las VCAM (por sus siglas en inglés Intercelular Adhesión Molecule-1 y Vascular Cell Adhesion Molecule-1, respectivamente). Más tarde, los neutrófilos se unen a estas moléculas a través de sus receptores, iniciándose así su migración al tejido lesionado en unos pocos minutos [45], subsecuentemente los macrófagos también inician su migración. Tanto los neutrófilos como los macrófagos inician la fagocitosis del detritus, desencadenando el estallido respiratorio, que lleva a la excesiva producción de RL y al estrés oxidante [45]. Los

RL producidos durante este estallido son excelentes bactericidas, sin embargo, durante la lesión medular también dañan al tejido circundante.

Se ha demostrado que después de producirse una LTME se incrementa la síntesis de diversas sustancias que son pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), la interleucina 1 (IL-1) y los metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), asimismo, estas moléculas favorecen la activación y migración de más leucocitos, los que a su vez incrementan la síntesis de moléculas de adhesión en las células endoteliales [46], exacerbando el daño secundario. La inflamación generada después de la LTME favorece una disminución en la capacidad de recuperación dada por la formación de la cicatriz fibrilar, la progresiva formación de cavidades quísticas y la muerte de las neuronas y los oligodendrocitos, ya sea por apoptosis o por necrosis [47].

La respuesta inflamatoria desencadenada después de la LTME es de proporciones mayores comparada con la producida después de un traumatismo en la corteza cerebral [48]. Se sugiere que las moléculas específicas que promueven la inflamación tienen un papel importante en la neuropatología del daño secundario [45, 49]. Con esta información nuestro grupo evaluó el efecto neuroprotector de la dapsona un fármaco con capacidad anti-inflamatoria [50, 51]. Se sabe que disminuye la quimiotaxis, y la migración de los neutrófilos y su adhesión al endotelio, interfiere con la activación y la función de las proteínas G (tipo Gi), indispensables para iniciar la cascada de segundos mensajeros para el estímulo quimiotáctico, reduciendo la producción de RL y la secreción de sustancias tóxicas. El ácido hipocloroso es un potente oxidante producido por la mieloperoxidasa (MPO) una hemo-proteína localizada en los neutrófilos y la peroxidasa de eosinófilos, cuyas actividades son inhibidas por dapsona cuando se une de manera irreversible a su sitio catalítico [52], nosotros consideramos que la capacidad anti-inflamatoria de la dapsona podría ser importante como blanco

neuroprotector, por lo que en el 2011, evaluamos el efecto neuroprotector de dicho fármaco en un modelo de LTME en ratas.

Los resultados demostraron que el tratamiento tiene la capacidad de mejorar la función motora de los animales en un 70% en promedio, así como preservar una mayor cantidad de tejido nervioso, sin observarse efectos adversos que pongan en riesgo la vida los animales. Asimismo, se observó su capacidad antioxidante al inhibir la lipoperoxidación y disminuir la actividad de la MPO [53].

Apoptosis después de una lesión traumática de la médula espinal

La apoptosis es uno de los mecanismos de daño secundario que han sido objeto de estudio a nivel mundial dada su importancia. Se ha reportado que después de una LTME se activan las vías de señalización que llevan a las células a la muerte por apoptosis a través de dos vías, la primera inicia con la activación de receptores de muerte localizados en la superficie celular y la segunda por la alteración directa de la función mitocondrial. Durante el proceso de apoptosis, se condensa el citoplasma y la cromatina en el núcleo, las mitocondrias y los ribosomas se agregan [54]. Otras características de la apoptosis son la despolarización de la membrana interna mitocondrial lo que lleva a la acidificación intracelular, la generación de RL y la externalización de los residuos de fosfatidilserina [55].

Después de una LTME algunas células en el epicentro de la lesión mueren por necrosis post-traumático, mientras que otras mueren por apoptosis [56]. La muerte celular apoptótica se observa tanto en neuronas como en oligodendrocitos y es mayor en la sustancia blanca, en la que se observa degeneración walleriana simultáneamente. Por lo tanto, la apoptosis de neuronas y oligodendrocitos pueden contribuir en gran medida a la parálisis de los pacientes con LTME [57]. Estudios realizados en ratas con LTME revelaron que la apoptosis se observa a tiempos cortos (4 h después de la lesión), sin embargo puede estar presente hasta

tres semanas después del daño en menor proporción [58]. Asimismo, la activación de caspasas se produce en las neuronas en el sitio de la lesión dentro de unas cuantas horas, mientras que en los oligodendrocitos adyacentes que se encuentran lejos del sitio de la lesión este evento puede observarse en periodos de varios días, por lo que el déficit neurológico a largo plazo después de un traumatismo puede deberse en parte a la apoptosis de neuronas y oligodendroglia en regiones distantes.

La familia de las caspasas (proteasas de cisteína) regula la ejecución de la apoptosis, la caspasa-9 es activada por la acción del citocromo c que se libera de la mitocondria cuando se despolariza la membrana interna, este se une al Apaf-1 y una vez unido activan a la procaspasa-9 y finalmente este complejo activa a la caspasa-3 [11]. Por otra parte, la caspasa-8 se activa cuando el TNF α se une a su receptor al que se le ha denominado receptor de muerte a través de este mecanismo inicia la vía de activación de la apoptosis independiente de Ca²⁺. El inhibidor de la activación de caspasa-3 como la desoxirribonucleasa, puede ser una estrategia para regular la muerte celular.

Por otra parte, existen reportes que demuestran que el estado redox de la célula es clave para el inicio de la apoptosis, por ejemplo, se sabe que la relación glutatión reducido / glutatión oxidado (GSH / GSSG) contribuyen de manera importante en el mantenimiento de dicha condición. Las pruebas demostraron que la disminución de GSH celular se asoció con una mayor cantidad de apoptosis mientras que los aumentos en GSH se asocian con la expresión de la proteína anti-apoptótica, Bcl-2 [59]. Para controlar la activación de las caspasas que pueden llevar a la muerte celular, se han utilizado moléculas inhibitoras que interactúan directamente con los moduladores de la muerte celular. Por ejemplo, el inhibidor ligado al cromosoma X de la apoptosis y el inhibidor de la apoptosis neuronal son proteínas en las neuronas que inhiben directamente la actividad caspasa-3 y protegen a las neuronas de la lesión [55]. El inhibidor de la proteína

de apoptosis (IAP) de la familia de proteínas anti-apoptóticas, que se conservan a través de la evolución con homólogos encontrados en especies de vertebrados e invertebrados, tienen una función clave en la regulación negativa de la muerte celular programada en una variedad de organismos. Varios homólogos de mamíferos (XIAP, CIAP-1, CIAP-2, NAIP, Bruce, survivina, y PIAP) han sido identificados, la mayoría de los cuales han demostrado que inhiben la muerte celular. Aunque el mecanismo bioquímico por el cual las proteínas de la familia IAP suprimen la apoptosis es controvertido, al menos algunas de las IAP humanas (XIAP, CIAP-1 y CIAP-2) se sabe que se unen directamente e inhiben a las caspasas, incluyendo ciertas caspasas como la 3, -7 y -9. Así, PAI pueden inhibir tanto las caspasas que se activan por la vía de daño mitocondrial como las que se activan a través del receptor de muerte [60].

Estrategias neuroprotectoras

Los tratamientos neuroprotectores están dirigidos a regular o inhibir los principales mecanismos de daño durante la etapa aguda después de ocurrida una LTME (Figura 4).

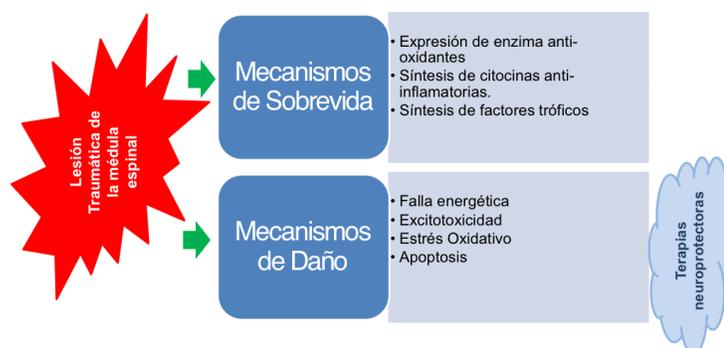


Figura 4. Imagen en la que se muestran los principales mecanismos de daño secundario que se desencadenan durante la etapa aguda después de una lesión traumática de la médula espinal y que se su regulación o inhibición se ha propuesto como blancos terapéuticos neuroprotectores eficaces.

Fármacos neuroprotectores en modelos animales

Un fármaco recientemente utilizado en diversos padecimientos neurológicos es la edavarona. Se ha reportado que tiene efecto anti-oxidante, anti-inflamatorio y anti-apoptótico, su uso en pacientes está aprobado por las autoridades Japonesas desde el año 2001. Tomando en cuenta estos antecedentes este tratamiento se ha utilizado en diversos estudios experimentales y clínicos como el accidente cerebrovascular, la lesión de la médula espinal, la lesión cerebral traumática, enfermedades neurodegenerativas y los tumores cerebrales. La seguridad probada de la edavarona después de 9 años de uso sugiere que puede tener un enorme potencial terapéutico en múltiples trastornos neurológicos en los seres humanos [61].

Anticuerpos monoclonales

Después de un trauma focal del cerebro o de la médula espinal se liberan diversas moléculas neurotóxicas endógenas en el SNC, dando lugar a reacciones celulares adversas. Algunos estudios han demostrado que la serotonina (5-HT), dinorfina A (Dyn A 1-17), NOS, y TNF- α podrían ser posibles señales neurotóxicas en las lesiones del sistema nervioso central. Por lo tanto, se ha propuesto que la inhibición de estas moléculas utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la 5-HT, SON, Dyn A (1-17), y TNF- α *in vivo* resultará en una buena opción para favorecer la neuroprotección y mejorar la recuperación funcional después de un trauma. Además, una combinación adecuada de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, SON y TNF- α , cuando se aplica 60-90 min después de un trauma, es capaz de mejorar la capacidad neuroprotectora y disminuir el daño al tejido nervioso después de una lesión de la médula espinal, de acuerdo con los hallazgos de Sharma y Sharma [62] en los que estas estrategias mejoran la función neurológica, ellos han sugerido un uso potencial de anticuerpos monoclonales como agentes terapéuticos adecuados en las lesiones del SNC para lograr neuroprotección y neuroreparación.

Estrategias farmacológicas neuroprotectoras después de una LTME.**Avances clínicos****Anti-excitotóxicos**

Riluzol. La terapia con riluzol ha sido probada en modelos de LTME y recientemente se ha propuesto su uso en pacientes con lesiones de la médula espinal, considerando que inhibe la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas, al regular la expresión y la actividad del transportador de Glu de los astrocitos (GLT-1) y conociendo que la regulación del transporte de Glu puede ser considerado un blanco terapéutico, Carbone y col. [63], probaron su efecto neuroprotector en un modelo de la enfermedad de Parkinson, inyectando 6-hidroxidopamina, los resultados demostraron una reducción en la degeneración de las neuronas de dopamina así como disminución en la pérdida de la tirosina hidroxilasa estriatal, los autores concluyen que el riluzol es un agente neuroprotector eficaz, que puede ser incluido en padecimientos con daño celular. Así mismo, se ha usado como tratamiento en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La ELA es una enfermedad neurodegenerativa, cuya fisiopatología está asociada con una alteración del sistema de neurotransmisión glutamatérgica, que lleva a la muerte de las neuronas motoras desencadenado por la excesiva activación de receptores de Glu en la hendidura sináptica.

Esta teoría "excitotóxica" de ELA ha dado lugar al desarrollo ensayos clínicos con riluzol sabiendo que funciona como antagonista indirecto de los receptores de Glu, además de inhibir los canales de Na^+ dependientes de voltaje neuronales. El riluzol sigue siendo la única terapia aprobada como tratamiento en pacientes con ELA [64]. El riluzol ha despertado el interés como un fármaco potencialmente neuroprotector para el tratamiento de la LTME. En la actualidad, Fehlings y col. [65] realizaron un estudio Fase I para evaluar la seguridad y la farmacocinética del riluzol en pacientes con LTME, dicho estudio se está realizando por la Red de Ensayos Clínicos de América del Norte (NACTN) para el

tratamiento de lesiones de la médula espinal, sin embargo todavía no se cuenta con resultados funcionales y clínicos en los pacientes. Registro de ensayos clínicos no: NCT00876889 [65].

Inmunosupresores

Rapamicina. Se desarrolló originalmente como un agente antifúngico, pero más tarde se introdujo en la medicina clínica como un eficiente inmunosupresor se sabe que mediante la inhibición de mTOR previene la fosforilación de p70S6K, 4EBP1 y otras proteínas relacionadas con la transcripción, traducción y control del ciclo celular, aumenta la autofagia, tiene la capacidad para prevenir la re-estenosis arterial coronaria y el cáncer de piel en ratones a través de sus efectos antiproliferativos. Se ha demostrado que tanto la necrosis como la apoptosis contribuyen a la pérdida de células neuronales después de una LTME [11, 66]. Recientemente, se ha demostrado que después de una LTME por contusión en ratas, los niveles de LC3-II (un marcador de la autofagia) se incrementan en las neuronas cercanas al epicentro de la lesión [67].

Estos hallazgos sugieren que la autofagia puede tener un papel importante en las respuestas de la médula espinal al trauma por contusión, se conoce que la autofagia es un mecanismo de degradación citoplasmática aberrante que inicia en condiciones de falla energética. La importancia de la autofagia fue planteada en enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson y el Alzheimer, en las que la autofagia puede ser un mecanismo neuroprotector [68]. En padecimientos como isquemia cerebral focal [69], hemorragia cerebral [70], lesión traumática cerebral [71, 72] y LTME [67] la autofagia se incrementa en el sitio de la lesión, por lo que la regulación de este evento ha despertado un gran interés como estrategia neuroprotectora. Recientemente se ha demostrado que la rapamicina puede inducir la degradación de acumulaciones no deseadas tales como la huntingtina mutante y el amiloide- beta a través del incremento de la inducción de la autofagia [73, 74]. Además al aumentar la expresión de la autofagia se observa

neuroprotección después de un trauma cerebral y en el daño cerebral por hipoxia [75, 76]. Asimismo, la rapamicina es capaz de disminuir los niveles del TNF α en modelos de muerte celular tanto *in vitro* como en modelos *in vivo* [75, 77, 78].

Esto sugiere que este fármaco puede tener mecanismos de acción múltiples en la neuroprotección después de una LTME. Con estos antecedentes se probó su efecto neuroprotector en ratas con LTME. Los resultados demostraron que la rapamicina mejora la función motora, disminuye la expresión del TNF α en la microglia y promueve la preservación de las células neuronales lo que sugiere un efecto neuroprotector, tomando en cuenta que la rapamicina ya se utiliza en la clínica podría facilitar los primeros ensayos clínicos en pacientes con LTME [79].

Sin embargo, existen resultados controversiales al respecto, recientemente se probó el tratamiento con rapamicina para dilucidar el papel de la autofagia en la recuperación neurológica después de una LTME. En un estudio realizado por Zhang y col. [80], se investigó el papel neuroprotector del factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, por sus siglas en inglés) tanto *in vivo* como *in vitro* y demostraron que la autofagia excesiva y la acumulación de proteína ubiquitinada está involucrado en el modelo de LTME en la rata. Los resultados indicaron que la administración de bFGF mejoró la recuperación funcional y aumentó la sobrevivencia de las neuronas en las lesiones de la médula espinal en el modelo de rata. El efecto protector de bFGF se relaciona con la inhibición de la autofagia y la terapia combinada con rapamicina abolió parcialmente el efecto protector de bFGF

Anti-inflamatorios

Minociclina. La neuroprotección asociada con la administración de minociclina se demostró primero en un modelo de isquemia del cerebro en el jerbo [81] y posteriormente en modelos de la enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, lesión cerebral traumática, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica [82]. La minociclina también ha mostrado ser eficaz en modelos

animales con LTME [83, 84, 85], recientemente Sonmez y col.[86] probaron la eficacia de la minociclina después de una LTME en ratas, los resultados demostraron que el tratamiento inhibió la lipoperoxidación, conservó la ultraestructura de la médula espinal y favoreció la recuperación funcional motora en los animales. Sin embargo y a pesar de los reportes que demuestran claramente el beneficio terapéutico de la minociclina, existen dos trabajos en los cuales el tratamiento no produce beneficios similares [87, 88]. Los mecanismos de acción de este medicamento incluyen, inhibición de la activación y de la proliferación de la microglia, reducción de la excitotoxicidad, estabilidad de la función mitocondrial que da como resultado una disminución de la apoptosis neuronal y oligodendroglial, disminución en la producción de RL, inhibición de actividad de la SON y de las metaloproteinasas, reducción de la inflamación, además de funcionar como un quelante de Ca^{2+} [82]. Con estos antecedentes el uso de la minociclina resulta atractivo para probar su eficacia en ensayos clínicos, aunado a que se utiliza en pacientes con enfermedades dermatológicas desde hace 30 años [89] y tomando en consideración que los efectos adversos son raros y solo se observan cuando su administración es a largo plazo (meses a años) [90, 91].

En la actualidad se utiliza como tratamiento en ensayos clínicos de la enfermedad de Huntington (Huntington Study Group, 2004) [92], la enfermedad de Parkinson (NINDS NET-PD Investigators, 2008) [93] y la esclerosis lateral amiotrófica, en los cuales se han administrado dosis de hasta 200 mg/día por vía oral, sin embargo cuando se administran dosis más altas se han observado efectos adversos gastrointestinales y niveles séricos elevados de nitrógeno uréico en sangre y de enzimas hepáticas [94]. Por otra parte, la dosis de 100 mg dos veces al día para el tratamiento de la esclerosis múltiple en etapa de brote no produjo toxicidad significativa [95, 96], de manera particular, en estos ensayos se emplea la minociclina administrada por vía oral por largos períodos de tiempo (6 semanas a 6 meses). Recientemente, la minociclina se ha administrado en dosis

altas (hasta 10 mg/kg) por vía intravenosa en pacientes con accidente cerebrovascular por 72 h sin efectos adversos significativos [97].

De acuerdo con estos antecedentes la mayoría de los estudios clínicos con minociclina en enfermedades neurológica han sido alentadores, a pesar de esto existe un ensayo aleatorizado y controlado con placebo en la esclerosis lateral amiotrófica, donde la minociclina se asoció con deterioro clínico. Es probable que estos hallazgos estén relacionados con las características de este padecimiento (enfermedad degenerativa crónica) que tiene poco en común con trastornos agudos como la LTME o el accidente cerebrovascular, o las enfermedades inflamatorias como la esclerosis múltiple. Por consiguiente, la eficacia de la minociclina puede diferir a través de estas condiciones. Dada la evidencia convincente de beneficio demostrado en modelos animales con LTME y su bioseguridad en los seres humanos, actualmente se realiza un estudio doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo para probar su eficacia en pacientes con LTME.

Este estudio se llevó a cabo en un solo centro hospitalario con la finalidad de optimizar la dosis terapéutica, así como evaluar la bioseguridad y estimar la variabilidad de los resultados para hacer un cálculo adecuado del tamaño de muestra, se evaluó durante 7 días, la función neurológica, los eventos adversos farmacológicos en los pacientes que recibieron minociclina por vía intravenosa (n = 27) y se compararon con el grupo placebo (n = 25). Los resultados mostraron que el tratamiento con la minociclina administrada en dosis superiores a las reportadas previamente en humanos produjo concentraciones en estado estacionario de 12.7 mg / ml (IC del 95% 11,6-13,8) en el suero y 2.3 mg / ml (IC del 95% 2.1 a 2.5) y en el líquido cefalorraquídeo, semejantes a las concentraciones que demostraron tener efecto terapéutico eficaz en estudios con animales. La elevación transitoria de las enzimas hepáticas en suero en un

paciente fue el único evento adverso probablemente relacionado con el fármaco del estudio.

En general, los pacientes tratados con minociclina experimentaron mayor recuperación motora (seis puntos) al ser comparados con los observados en el grupo placebo (95% intervalo de confianza -3 a 14, $p = 0,20$, $n = 44$). No se observó ninguna diferencia en la recuperación de lesiones de la médula espinal torácica ($n = 16$). Se observó una diferencia de 14 puntos motores que no alcanzó a ser significativo en los pacientes con lesión cervical (intervalo de confianza del 95% 0-28, $p = 0,05$, $n = 25$). Los pacientes con lesiones cervicales motoras incompletas, mostraron una diferencia en la recuperación funcional más grande (resultados no estadísticamente significativos, $n = 9$). Los resultados funcionales mostraron diferencias que carecían de significancia estadística, pero que pueden ser indicativos de mejoría en los pacientes que recibieron el medicamento en el estudio. Los autores concluyen que: el tratamiento con minociclina demostró ser factible, seguro y se asoció con una tendencia hacia la mejoría funcional. Aunque este estudio no demuestra la eficacia de la minociclina en lesiones de la médula espinal, los resultados son alentadores y justifican una investigación adicional en un ensayo multicéntrico de fase III, que ya ha sido registrado (ClinicalTrials.gov número NCT00559494) [98].

Metilprednisolona. El uso de los corticoesteroides en el tratamiento de la lesión medular se ha estudiado ampliamente, se sabe que su empleo resulta benéfico por las propiedades anti-inflamatorias de estos fármacos reduciendo la formación de edema generado a su vez por el proceso inflamatorio local [99]. La Metilprednisolona (MP) fue considerado hasta hace poco el fármaco de elección para el tratamiento del paciente con LTME. Se sabe que la MP ejerce un efecto neuroprotector al suprimir la respuesta inflamatoria tisular vía la inhibición de la función de las células inflamatorias, incluyendo la quimiotaxis [100], la fagocitosis [101], la síntesis de mediadores inflamatorios y la liberación de enzimas

lisosomales [102]. Además, la MP tiene la capacidad de inhibir a la fosfolipasa A2 [103], enzima que cataliza la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana, que a su vez dan inicio a la formación de eicosanoides sintetizados por la activación de la ciclo-oxigenasa y la lipo-oxigenasa. La producción de eicosanoides exacerba la respuesta inflamatoria y por lo tanto la producción de RL [104, 105]. Se han realizado tres importantes estudios clínicos para evaluar la eficiencia de la MP en pacientes con LTME. En el primer estudio nacional (Estados Unidos) de lesión traumática de la médula espinal aguda (NASCIS-I por sus siglas en Inglés), se trató a 330 pacientes y se evaluó la eficacia de la MP administrada en un bolo inicial de 1g por vía i.v., seguido de una dosis de 100 mg/día por 10 días, este grupo fue comparado con un grupo control que solo recibió placebo. Los resultados no fueron satisfactorios, lo que llevó a cuestionar la eficacia del fármaco [106, 107]. Posteriormente, se llevó a cabo el segundo estudio (NASCIS-II) donde se evaluó la eficacia de la MP con una dosis de un bolo inicial de 30mg/kg en los primeros 15 min y 45 min después una infusión continua de 5.4 mg/kg/h por 23 h [108, 101].

Los resultados de este estudio no fueron contundentes y nuevamente se produjo controversia al reportar que existían tendencias de menor recuperación motora en los pacientes cuyo inicio del tratamiento fue después de las primeras 8 h, por lo que, se decidió cambiar la ventana terapéutica sin dar una explicación lógica, esto después de haber analizado los datos, comprometiendo así el valor científico del estudio [109]. Con respecto a la recuperación funcional sensitiva solo se observó mejoría 6 meses después del daño, sin embargo, el efecto desapareció un año después. Con respecto a la evaluación de la función motora fue estadísticamente mejor a los 6 meses y se mantuvo así hasta un año después de la LTME. No obstante a estos hallazgos, los resultados del NACIS-II fueron ampliamente cuestionados.

En un tercer estudio (NASCIS-III) se desarrolló un nuevo tratamiento de 48 h con MP iniciando con un bolo de 30 mg/kg i.v. seguido de una infusión continua de 5.4 mg/kg/h por 47 h que podría llevar a una mejor recuperación neurológica que la dosis anteriormente empleada (un bolo inicial de 30 mg/kg en los primeros 15 min y 45 min después una infusión continua de 5.4 mg/kg/h por 23 h), además, en este mismo estudio se probó la eficacia del mesilato de tirilazad (MT) un potente fármaco no glucocorticoide que tiene la capacidad de inhibir la lipoperoxidación, finalmente también se evaluaría el efecto de la MP administrado en pacientes con lesión completa y lesión incompleta. En este estudio no se incluyó un grupo de pacientes a los que solamente se les tratara con placebo ya que previamente se conocían los beneficios de la MP [110, 111], sin embargo, también se excluyeron los pacientes con lesión por arma de fuego y los que presentaban un peso de más de 109 kg. Los resultados indicaron que la MP debe administrarse en altas dosis y únicamente por 24 h en los pacientes que inician el tratamiento dentro de las primeras 3 h, no así en los pacientes que iniciaron el tratamiento después de las 3 y hasta las 8 h, ya que ellos deben someterse a un tratamiento por 48 h.

Finalmente, en los pacientes tratados con mesilato de tirilazad por 48 h presentaron mejoría funcional solo con la administración conjunta de MP por 24 h [110]. En seguimiento de estos estudios, muchos reportes posteriores consideran que las altas dosis de MP que se administran en infusión por 24 h dentro de las primeras 8 h después de una LTME no deben tomarse como estándar de tratamiento, sino por el contrario este tratamiento únicamente ejerce efectos benéficos muy modestos [112], además de tener efectos negativos y complicaciones pulmonares y gastrointestinales [113]. En estudios más recientes, Molano y col.[114] reportaron que el uso profiláctico de la MP como agente neuroprotector durante la cirugía de la columna vertebral en pacientes con LTME causa grandes complicaciones por lo que los autores sugieren que se debe prescindir dicho tratamiento. Pointillart y col. [115], mostraron que los pacientes

tratados con MP no presentaron mejoría funcional al compararse con los que solo recibieron placebo.

Con base en esto, las asociaciones; the Canadian Neurosurgery Society, the Canadian Spine Society y the Canadian Association of Emergency Physicians acordaron que las altas dosis de la MP que se administran en infusión por 24 h dentro de las primeras 8 h después de una LTME no deben tomarse como estándar de tratamiento [116]. Adicionalmente, la FDA de los Estados Unidos no ha aprobado el uso de la MP como tratamiento para la lesión medular traumática y ni siquiera existe un proceso público de validación de esa Agencia para la indicación terapéutica señalada. Esta situación ha generado problemas médicos legales en los Estados Unidos [117]. Hugenholtz y col. [112] publicaron una revisión sistematizada en la que reportan las evidencias de los trabajos clínicos con los resultados de la evaluación neurológica, así como un resumen de evidencias de complicaciones asociadas a las altas dosis de MP. Las conclusiones de esta revisión señalan que: 1) no existen evidencias suficientes para justificar el uso de altas dosis de MP como un estándar de tratamiento o como una guía de tratamiento dentro de las primeras 8 h después de una lesión cerrada 2) La MP prescrita como una infusión en bolo i. v. por 15 min con 30 mg/kg de peso, 45 min después de una infusión continua de 5.4 mg/kg de peso por 23 h es un esquema de tratamiento opcional para el cual solo hay una débil evidencia, señalan que son insuficientes las evidencias para respaldar la infusión continua de MP más allá de 23 h.

Los reportes de Sayer y col. [118, 119, 120, 121] aportan evidencias para no administrar MP después de una lesión, Hurlbert y Hamilton [122] reportan los resultados de encuestas realizadas a residentes y cirujanos sobre el uso de MP en los últimos 5 años, las conclusiones indican que cada día es menor el número de médicos que la utiliza con estándar de tratamiento y un porcentaje mayor refiere que debe ser tomado como un tratamiento opcional o no debe ser administrado.

Recientemente, Chikuda y col. [123] analizaron los efectos adversos así como la morbimortalidad que se observó en pacientes Japoneses con LTME a nivel cervical que recibieron altas dosis de MP y lo compararon con el grupo que no recibió tratamiento, en este reporte se identificaron 3,508 pacientes con lesión medular cervical (2,652 hombres y 856 mujeres, con una edad promedio de 60.8 ± 18.7 años), incluyendo 824 (23,5%) de los pacientes que recibieron altas dosis de metilprednisolona. Los resultados demostraron un incremento significativo en la aparición de hemorragias por úlceras gastrointestinales (68/812 frente a 31/812, $p < 0,001$) en el grupo que recibió altas dosis de MT.

En general, el grupo con MT demostró un riesgo significativamente mayor de sufrir complicaciones (144/812 vs 96/812; OR 1.66, IC 1.23 a 2.24 del 95%, $p = 0,001$) al compararse con el grupo control. Además, se demostró que no hubo diferencia significativa en la mortalidad hospitalaria entre el grupo tratado con alta dosis de MP y el grupo control ($p = 0.884$).

Finalmente Druschel y col. [124] elaboraron un cuestionario en Alemania para conocer la frecuencia con que se administra la MP, además del esquema de tratamiento empleado, así como las causas por las cuales se utiliza dicho tratamiento en pacientes con LTME. La encuesta fue contestada por 372 participantes. Los resultados demostraron que: el 73% son usuarios "frecuentes" que administran MPSS a menos del 50% de sus pacientes, el diez por ciento prescriben el esquema sugerido en el NASCIS I, 43% NASCIS II, 33% NASCIS III y el 13% "protocolos genéricos", La justificación para el uso del tratamiento con MP, en primer lugar "eficacia", después por "práctica común" y finalmente por "razones médico-legales", en este reporte también se observó que cada vez menos especialistas consideran que el tratamiento con MP tiene beneficios terapéuticos para estos pacientes.

Dapsona. Como se mencionó previamente, existen evidencias de que la dapsona es un fármaco seguro que ha demostrado tener mecanismos neuroprotectores en modelos de excitotoxicidad, infarto cerebral y LTME, además de ser un fármaco que se utiliza en la clínica para el tratamiento de diversas enfermedades dermatológicas y de manera reciente se utilizó como tratamiento anti-epiléptico en pacientes con epilepsia resistente a fármacos [125] y en el 2007 nuestro grupo probó el efecto neuroprotector de la dapsona en pacientes con infarto cerebral [126], estas características hacen de la dapsona un tratamiento interesante para ser probado en pacientes con LTME. Con base en esta información 2007 nuestro grupo probó el efecto neuroprotector de la dapsona administrada durante la etapa aguda después del daño. El protocolo fue elaborado de acuerdo a los principios éticos necesarios para la investigación clínica en humanos (ICH Expert Working Group, 1996; Asociación Médica Mundial, 2008) y fue evaluado y aprobado el 1 de febrero del 2008 por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, el 28 de enero del 2009 por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el 19 de noviembre del 2009 por la Comisión de Ética, Bioseguridad e Investigación de la Secretaría de Salud del Gobierno del Distrito Federal (D.F.) y el 14 de octubre del 2011 por la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación. Cinco pacientes recibieron tratamiento con dapsona la edad promedio fue de 36 años, el 100% fueron del género masculino y el 60% se encontraba en su lugar de trabajo al momento del accidente. Cuatro pacientes presentaron lesiones a nivel de las vértebras lumbares y solo uno en las cervicales, no se observaron efectos adversos asociados al tratamiento y tres de los pacientes mostraron mayor recuperación funcional (resultados preliminares).

Estrategias para organizar los estudios clínicos.

Para realizar estudios clínicos en pacientes con LTME en E.U. existe la NACTN que es una organización de 10 departamentos de neurocirugía, un centro de gestión de datos y un centro farmacológico. El NACTN se estableció con el

objetivo de difundir los últimos avances en áreas de la medicina molecular, celular, neuroprotección y regeneración tanto en modelos animales como en ensayos clínicos para optimizar la información de los resultados que garanticen terapias seguras para los pacientes, la organización de la red de hospitales es capaz de inscribir a un número suficiente de pacientes para la realización de ensayos clínicos de Fase I y II tomando la información creada en el Centro de Gestión de datos que contiene la historia natural de la recuperación de los pacientes después de sufrir una lesión, la base de datos tiene información como: incidencia y gravedad de las complicaciones que se producen durante el tratamiento agudo y subagudo después de la lesión, mientras que el Centro Farmacológico es capaz de realizar estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de los medicamentos con potencial terapéutico; actualmente se tiene registrado un estudio clínico Fase I con riluzol [127].

Conclusiones

Existen grandes avances en el conocimiento de la fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal, se han dilucidado la importancia y participación de algunos mecanismos que son clave en el deterioro del tejido nervioso de la médula espinal, se han propuesto cuatro principales blancos terapéuticos que son: la inhibición del estrés oxidante, de la excitotoxicidad, la inflamación y la apoptosis, sin embargo, no existen terapias farmacológicas neuroprotectoras lo suficientemente efectivas que logren regular o contrarrestar estos eventos, de manera exitosa. En la actualidad se siguen buscando terapias que administradas solas o en combinación, logren revertir el daño inicial, por lo que es importante destacar que no contamos con tratamientos neuropotectores terapéuticamente eficaces para este padecimiento.

Referencias

1. Cripps, R.A., Lee, B.B., Wing, P., Weerts, E., Mackay, J. and Brown, D. (2011) Spinal Cord. 49, 493-501.

2. Bauchet, L., Lonjon, N., Perrin, F.E., Gilbert, C., Privat, A. and Fattal, C. (2009) *Ann Phys Rehabil Med.* 52, 330-351.
3. Ning, G.Z., Wu, Q., Li, Y.L. and Feng, S.Q. (2012) *J Spinal Cord Med.* 35, 229-239.
4. Pardini, C.M. (1998). Tesis de Doctorado de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.
5. Kwon, B.K., Tetzlaff, W., Grauer, J.N., Beiner, J. and Vaccaro, A.R. (2004) *Spine J.* 4, 451-464.
6. Tator, C.H. (1995) *Brain Pathol.* 5, 407-413.
7. Agrawal, S.K. and Fehlings, M.G. (1996) *J, Neurosci.* 16, 545-552.
8. Schwab, J.M., Brechtel, K., Mueller, C.A., Failli, V., Kaps, H.P., Tuli, S.K. and Schluesener, H.J. (2006) *Prog Neurobiol.* 78, 91-116.
9. Diaz-Ruiz, A., Salgado-Ceballos, H., Montes, S., Guizar-Sahagún, G., Gelista-Herrera, N., Mendez-Armenta, M., Diaz-Cintra, S. and Ríos, C. (2011) *J Neurosci Res.* 89, 373-380.
10. Wrathall, J.R., Teng, Y.D. and Choiniere, D. (1996) *Exp Neurol.* 137, 119-126.
11. Springer, J.E., Azbill, R.D. and Knapp, P.E. (1999) *Nat Med.* 5, 943-946.
12. Profyris, C., Cheema, S.S., Zang, D., Azari, M.F., Boyle, K. and Petratos, S. (2004) *Neurobiol. Dis.* 15, 415-436.
13. Genovese, T., Mazzon, E., Muià, C., Patel, N.S., Threadgill, M.D., Bramanti, P., De Sarro, A., Thiemermann, C. and Cuzzocrea, S. (2005) *J Pharmacol Exp Ther.* 312, 449-457.
14. Diaz-Ruiz, A., Salgado-Ceballos, H., Montes, S., Maldonado, V., Tristan, L., Alcaraz-Zubeldia, M. and Ríos, C. (2007) *Neurochem Res.* 32, 57-63.
15. Aust, S.D., Morehouse, L.A. and Thomas, C.E. (1985) *J Free Rad Biol Med.* 1, 23-25.
16. Ebadi, M., Iversen, P.L., Hao, R., Cerutis, D.R., Rojas, P., Happe, H.K., Murrin, L.C. and Pfeiffer, R.F. (1995) *Neurochem Int.* 27, 1-22.
17. Aschner, M. (1996) *FASEB J.* 10, 1129-1136.
18. Mohanakumar, K.P. and Muralikrishnan, D. (2000) In *Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders* M.A. Collins & A. Storch Eds: 289-293. Kluwer Academic/Plenum, New York.
19. Facchinetti, F., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (1998) *Cell Mol Neurobiol.* 18, 667-682.
20. Padh, H. (1991) *Nutr Rev.* 49, 65-70.
21. Mohanakumar, K.P., Kochupurackal, P., Thomas, B., Sharma, S.M., Muralikrishnan, D., Chowdhury, R. and Chiueh, C.C. (2002) *Ann N Y Acad Sciences.* 962, 389-401.
22. Lei, S.Z., Pan, Z.H., Aggarwal, S.S.K., Chen, H.S.V., Hartman, J., Sucher, N.J. and Lipton, S.A. (1992) *Neuron.* 8, 1087-1099.
23. Davies, K.J. and Goldberg, A.L. (1987) *J Biol Chem.* 262, 8227-8234.
24. Teebor, G.W., Boorstein, R.J. and Cadet, J. (1988) *Int J Radiat Biol.* 54, 131-150.
25. Virág, L. and Szabó, C. (2002) *Pharmacol Rev.* 54, 375-429.

26. Cosi, C., Suzuki, H., Milani, D., Menegazzi, M., Vantini, G., Kanai, Y. and Skaper, S.D. (1994) *J Neurosci Rev.* 39, 38-46.
27. Zhang, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Snyder, S.H. (1994) *Science.* 263, 687-689.
28. Dawson, T.M. and Dawson, V.L. (1995) *New Horiz.* 3, 85-92.
29. Al-Gonaiah, M., Smith, R.A. and Stone, T.W. (2009) *Brain Res.* 1280, 33-42.
30. Cañas, P.E. (1999) *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 49, 13-20.
31. Boda, D. (2011) *J Perinat Med.* 39, 441-444.
32. Traystman, R.J., Kirsch, J.R. and Koehler, R.C. (1991) *J Appl Physiol.* 71, 1185-1195.
33. O'Regan, M.H., Smith-Barbour, M., Perkins, L.M., Cao, X. and Phillis, J.W. (1994) *Neuropharmacology.* 33, 1197-120.
34. Dugan, I.L. and Choi, D.W. (1994) *Ann Neurol.* 35, 517-521.
35. Titworth, W.L., Liu, N.K. and Xu, X.M. (2008) *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 7, 254-269.
36. Ciani, E., Groneng, L., Voltattorni, M., Rolseth, V., Constestabile, A. and Pausen, R.E. (1996) *Brain Res.* 728, 1-6.
37. Diaz-Ruiz, A., Rios, C., Duarte, I., Correa, D., Guizar-Sahagun, G., Grijalva, I. and Ibarra, A. (1999) *Neurosci Lett.* 266, 61-64.
38. Diaz-Ruiz, A., Rios, C., Duarte, I., Correa, D., Guizar-Sahagun, G., Grijalva, I., Madrazo, I and Ibarra, A. (2000) *Neuroreport.* 11, 1765-1767.
39. Díaz-Ruiz, A., Ibarra, A., Pérez-Severiano, F., Guizar-Sahagún, G., Grijalva, I. and Ríos, C. (2002) *Neurosci Lett.* 319, 129-132.
40. Diaz-Ruiz, A., Vergara, P., Perez-Severiano, F., Segovia, J., Guizar-Sahagún, G., Ibarra, A. and Ríos, C. (2004) *Neurosci Lett.* 357, 49-52.
41. Diaz-Ruiz, A., Vergara, P., Perez-Severiano, F., Segovia, J., Guizar-Sahagún, G., Ibarra, A. and Ríos, C. (2005) *Neurochem Res.* 30, 245-251.
42. Diaz-Ruiz, A., Alcaraz-Zubeldia, M., Maldonado, V., Salgado-Ceballos, H., Mendez-Armenta, M. and Rios, C. (2009) *Neurosci Lett.* 452, 56-59.
43. Arellano-Ruiz, S., Rios, C., Salgado-Ceballos, H., Méndez-Armenta, M., Del Valle-Mondragón, L., Nava-Ruiz, C., Altagracia-Martínez, M. and Díaz-Ruiz, A. (2012) *Neurosci Lett.* 514, 102-105.
44. Acarin, L., Gonzalez, B. and Castellano, B. (2000) *Eur J Neurosci.* 12, 3505-3520.
45. Carlson, S.L., Parrish, M.E., Springer, J.E., Doty, K. and Dossett, L. (1998) *Exp. Neurol.* 151, 77-88.
46. Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L. and Eng, L.F. (2000) *J Neurosci Res.* 59, 63-73.
47. Hausmann, O.N. (2003) *Spinal Cord* 41, 369-378.
48. Schnell, L., Fearn, S., Klassen, H., Schwab, M.E. and Perry, V.H. (1999) *Eur. J. Neurosci.* 11, 3648-3658.
49. Fitch, M.T., Doller, C., Combs, C.K. and Landreth, G.E. and Silver, J. (1999) *J Neurosci.* 19, 8182-8198.
50. Maloff, B.L., Fox, D., Bruin, E. and Di Meo, T.M. (1988) *Eur. J. Pharmacol.* 158, 85-89.
51. Zhu, Y.I. and Stiller, M.J. (2001) *J. Am. Acad. Dermatol.* 45, 420-434.

52. Bozeman, P.M., Learn, D.B. and Thomas, E.L. (1992) *Biochem Pharmacol.* 44, 553-563.
53. Diaz-Ruiz, A., Maldonado, P., Jiménez-García, K., Salgado-Ceballos, H. and Ríos, C. (2013) *Neuroscience Letters* (enviado)
54. Ekshyyan, O. and Aw, T.Y. (2004) *Front Biosci.* 1, 1567-1576.
55. Friedlander, R.M. (2003) *N Engl J Med.* 348, 1365–1375.
56. Byrnes, K.R., Stoica, B.A., Fricke, S., Di-Giovanni, S. and Faden AI. (2007) *Brain* 130, 2977–2992.
57. Mattson, M.P. (2000) *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1, 120–129.
58. Mizuno, Y., Mochizuki, H., Sugita, Y. and Goto, K. (1998) *Intern Med.* 37,192–193
59. Genovese, T., Esposito, E., Mazzon, E., Muià, C., Di Paola, R., Meli, R., Bramanti, P. and Cuzzocrea, S. (2008) *J Pharmacol Exp Ther.* 325,100-114.
60. Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C. and Dietrich, W.D. (2001) *J Neuropathol Exp Neurol.* 60, 422-429.
61. Kikuchi, K., Kawahara, K.I., Uchikado, H., Miyagi, N., Kuramoto, T., Miyagi, T., Morimoto, Y., Ito, T., Tancharoen, S., Miura, N., Takenouchi, K., Oyama, Y., Shrestha, B., Matsuda, F., Yoshida, Y., Arimura, S., Mera, K., Tada, K.I., Yoshinaga, N., Maenosono, R., Ohno, Y., Hashiguchi, T., Maruyama, I. and Shigemori, M. (2011) *Exp Ther Med.* 2, 771-775.
62. Sharma, A. and Sharma, H.S. (2012) *Int Rev Neurobiol.* 102, 23-45
63. Carbone, M., Duty, S. and Rattray, M. (2012) *BMC Neurosci.* 13, 38.
64. Cheah, B.C., Vucic, S., Krishnan, A.V. and Kiernan, M.C. (2010) *Curr Med Chem.* 17, 1942-199.
65. Fehlings, M.G., Wilson, J.R., Frankowski, R.F., Toups, E.G., Aarabi, B., Harrop, J.S., Shaffrey, C.I., Harkema, S.J., Guest, J.D., Tator, C.H., Burau, K.D., Johnson, M.W. and Grossman, R.G. (2012) *J Neurosurg Spine.* 17, 151-156.
66. Citron, B.A., Arnold, P.M., Sebastian, C., Qin, F., Malladi, S., Ameenuddin, S., Landis, M.E. and Festoff, B.W. (2000) *Exp Neurol* 166, 21-26.
67. Chen, H.C., Fong,T.H., Lee, A.W. and Chiu, W.T.(2012) *Spine (Phila Pa 1976)* 37,470
68. Nixon, R.A., Cataldo, A.M. and Mathews, P.M. (2000) *Neurochem Res* 25,1161.
69. Wen, Y.D., Sheng, R., Zhang, L.S., Han, R., Zhang, X., Zhang, X.D., Han, F., Fukunaga, K. and Qin, Z.H. (2008) *Autophagy* 4, 762- 669.
70. He, Y., Wan, S. and Hua, Y. (2008) *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 897.
71. Lai, Y., Hickey, R.W., Chen, Y., Bayir, H., Sullivan, M.L., Chu, C.T., Kochanek, P.M., Dixon, C.E., Jenkins, L.W., Graham, S.H., Watkins, S.C. and Clark, R.S. (2008) *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 540-550.
72. Liu, C.L., Chen, S., Dietrich, D. and Hu, B.R. (2008) *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 674-683.
73. Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O. and Klionsky, D.J. (2007) *Nat Rev Drug Discov* 6, 304-312.

74. Caccamo, A., Majumder, S., Richardson, A., Strong, R. and Oddo, S. (2010) *J Biol Chem* 285, 13107- 13120.
75. Erlich, S., Alexandrovich, A., Shohami, E. and Pinkas-Kramarski, R. (2007) *Neurobiol Dis.* 26, 86-93.
76. Carloni, S., Buonocore, G. and Balduini, W. (2008) *Neurobiol Dis* 32, 329.
77. Cicora, F., Lausada, N., Vasquez, D.N., Cicora, P., Zalazar, G., Gonzalez, P., Palti, G. and Raimondi, C. (2010) *Transplant Proc.* 42, 365-370.
78. Dheen, S.T., Kaur, C. and Ling, E.A. (2007) *Curr Med Chem* 14, 1189.
79. Chen, H.C., Fong, T.H., Hsu, P.W. and Chiu, W.T. (2013) *J Surg Res.* 179, e203-210.
80. Zhang, H.Y., Wang, Z.G., Wu, F.Z., Kong, X.X., Yang, J., Lin, B.B., Zhu, S.P., Lin, L., Gan, C.S., Fu, X.B., Li, X.K., Xu, H.Z. and Xiao, J. (2013) *Mol Neurobiol.* Mar 21.
81. Yrjanheikki, J., Keinanen, R., Pellikka, M., Hokfelt, T. and Koistinaho, J.(1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15769-15774.
82. Yong, V.W., Wells, J., Giuliani, F., Casha, S., Power, C. and Metz, L.M. (2004) *Lancet Neurol* 3, 744-751.
83. Lee, S.M., Yune, T.Y., Kim, S.J., Park, D.W., Lee, Y.K., Kim, Y.C., Oh, Y.J., Markelonis, G.J. and Oh, T.H. (2003) *J Neurotrauma* 20, 1017-1027.
84. Wells, J.E., Hurlbert, R.J., Fehlings, M.G. and Yong, V.W. (2003) *Brain* 126, 1628-1637.
85. Yune, T.Y., Lee, J.Y., Jung, G.Y., Kim, S.J., Jiang, M.H., Kim, Y.C., Oh, Y.J., Markelonis, G.J. and Oh, T.H. (2007) *J Neurosci* 27, 7751-761.
86. Sonmez, E., Kabatas, S., Ozen, O., Karabay, G., Turkoglu, S., Ogun, E., Yilmaz, C., Caner, H. and Altinors, N. (2013) *Spine (Phila Pa 1976).* Jan 30.
87. Lee, J.H., Tigchelaar, S., Liu, J., Stammers, A.M., Streijger, F., Tetzlaff, W. and Kwon, BK. (2010) *Exp Neurol* 225, 219-230.
88. Pinzon, A., Marcillo, A., Quintana, A., Stamler, S., Bunge, M.B., Bramlett, H.M. and Dietrich, W.D. (2008) *Brain Res* 1243, 146-51.
89. Gough, A., Chapman, S., Wagstaff, K., Emery, P. and Elias, E. (1996) *BMJ* 312, 169-172
90. Cunliffe, W.J (1996) *BMJ* 312, 1101
91. Shapiro, L.E., Knowles, S.R. and Shear N.H. (1997) *Arch Dermatol* 133, 1224-1230.
92. Huntington Study Group. (2004) *Neurology* 63:547-549.
93. NINDS NET-PD Investigators. (2008) *Clin Neuropharmacol* 31,141-150.
94. Gordon, P.H., Moore, D.H., Gelinias, D.F., Qualls, C., Meister, M.E., Werner, J., Mendoza, M., Mass, J., Kushner, G. and Miller, R.G.(2004) *Neurology* 62,1845-1847.
95. Metz, L.M., Zhang, Y., Yeung, M., Patry, D.G., Bell, R.B., Stoian, C.A., Yong, V.W., Patten, S.B., Duquette, P., Antel, J.P. and Mitchell, J.R. (2004) *Ann Neurol* 55, 756.
96. Zhang, Y., Metz, L.M., Yong, V.W., Bell, R.B., Yeung, M., Patry, D.G. and Mitchell, J.R. (2008) *Can J Neurol Sci* 35, 185-191.

97. Fagan, S.C., Waller, J.L., Nichols, F.T., Edwards, D.J., Pettigrew, L.C., Clark, W.M., Hall, C.E., Switzer, J.A., Ergul, A. and Hess, D.C. (2010) *Stroke* 41, 2283-2287.
98. Casha, S., Zygun, D., McGowan, M.D., Bains, I., Yong, V.W. and Hurlbert, R.J. (2012) *Brain* 135, 1224-1236.
99. Ducker, T.B and Zeidman, S.M. (1994) *Spine (Phila Pa 1976)*. 19, 2281-2287.
100. Espersen, G.T., Ernst, E., Vestergaard, M., Pedersen, J.O. and Grunnet, N. (1989) *Scand. J. Rheumatol.* 18, 51-56
101. Bracken, M.B., Shepard, M.J., Collins, W.F Jr., Holford, T.R., Baskin, D.S., Eisenberg, H.M., Flamm, E., Leo-Summers, L., Maroon, J.C., Marshall, L.F. Perrot, PL Jr., Piepmeier, J., Sonntag, V.K.H., Wagner, F.C Jr., Wilberger, J.L., Winn, H.R. and Young W. (1992) *J Neurosurg.* 76, 23-31.
102. Schleimer, R.P., Freeland, H.S., Peters, S.P., Brown, K.E. and Derse, C.P. (1989) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250, 598-605.
103. Hargreaves, K.M. and Costella, A. (1990) *Clin. Pharmacol. Ther.* 48, 168-178.
104. Williams, K.I. and Higgs, G.A. (1988) *J. Pathol.* 156, 101-110.
105. Flowers, R.J. R.P. Schleimer HN, Ford-Claman y Oronsky (eds). Academic Press: New York USA. 1989.
106. Bracken, M.B., Collins, W.F., Freeman, D.F., Shepard, M.J., Wagner, F.W., Silten, R.M., Hellenbrand, K.G., Ransohoff, J., Hunt, W.E., Perot, P.L Jr., Gossman, R.G., Green, B.A., Eisenberg, H.M., Rifkinson, N., Goodman, J.H., Meagher, J.N., Fischer, B., Clifton, G.L., Flamm, E.S. and Rawe, S.E. (1984) *JAMA* 251, 45-52.
107. Bracken, M.B., Shepard, M.J., Hellenbrand, K.G., Collins, W.F., Leo, L.S., Freeman, D.F., Wagner, F.C., Flamm, E.S., Eisenberg, H.M., Goodman, J.H., Perot, P.L Jr., Green, B.A., Grossman, R.G., Meagher, J.N., Young, W., Ficher, B., Clifton, G.L., Hunt, W.E. and Rifkinson, N. (1985) *J Neurosurg.* 63, 704-713.
108. Bracken, M.B., Shepard, M.J., Collins, W.F., Holford, T.R., Young, W., Baskin, D.S., Eisenberg, H.M., Flamm, E., Leo-Summers, L., Maroon, J., Marshall, L.F., Perot. P.L Jr., Piepmeier, J., Sonntag, V.K.H., Wagner, C., Wilberger, J.E. and Winn, HR. (1990) *N. Engl. J. Med.* 322, 1405-1411.
109. Nesathurai, S. (1998) *J Trauma* 45,1088-1093.
110. Bracken, M.B., Shepard, M.J., Holford, T.R., Leo-Summers, L., Aldrich, E.F., Fazl, M., Fehlings, M., Herr, D.L., Hitchon, P.W., Marshall, L.F., Nockels, R.P., Pascale, V., Perot, P.L. Jr., Piepmeier, J., Sonntag, V.K., Wagner, F., Wilberger, J.E., Winn, H.R. and Young W. (1997) *JAMA* 277, 1597-1604.
111. Bracken, M.B., Shepard, M.J., Holford, T.R., Leo-Summers, L., Adrich, E.F., Fazl, M., Fehlings, M.G., Herr, D.L., Hitchon, P.W., Marshall, L.F., Nockels, R.P., Pascale, V., Perot, P.L Jr., Piepmeier, J., Sonntag, V.K., Wagner, F., Wilberger, J.E., Winn, H.R. and Young, W. (1998) *J. Neurosurg.* 1998; 89: 699-706.

112. Hugenholtz, H., Cass, D.E., Dvorak, M.F., Fewer, D.H., Fox, R.J., Izukawa, D.M., Lexchin, J., Tuli, S., Bharatwal, N. and Short, C. (2002) *Can. J. Neurol. Sci.* 29, 227-235.
113. Matsumoto, T., Tamaki, T., Kawakami, M., Yoshida, M., Ando, M. and Yamada, H. (2001) *Spine (Phila Pa 1976)*. 26, 426-430.
114. Molano, M.R., Broton, J.G., Bean, J.A. and Calancie, B. (2002) *J. Neurosurg.* 96, 267-272.
115. Pointillart, V., Petitjean, M.E., Wiart, L., Vital, J.M., Lassié, P., Thicoipé, M. and Dabadie, P. (2000) *Spinal Cord* 38, 71-76.
116. Hugenholtz, H. (2003) *CMAJ* 168, 1145-1146.
117. Coleman, W.P., Benzel, D., Cahill, D.W., Ducker, T., Geisler, F., Green, B., Gropper, M.R., Goffin, J., Madsen, P.W. 3rd, Maiman, D.J., Ondra, S.L., Rosner, M., Sasso, R.C., Trost, G.R. and Zeidman, S. 2000) *J Spinal Disord.* 13, 185-199.
118. Sayer, F.T., Kronvall, E. and Nilsson, O.G. (2006) *The Spine Journal* 6, 335-343.
119. Miller, S.M. (2008) *J Neurosurg Anesthesiol.* 20,140-142.
120. Domino, K.B. (2008) *J Neurosurg Anesthesiol.* 20, 136.
121. Rozet, I. (2008) *J Neurosurg Anesthesiol.* 20, 137-139.
122. Hurlbert, R.J. and Hamilton, M.G. (2008) *Can J Neurol Sci* 35, 41-45.
123. Chikuda, H., Yasunaga, H., Takeshita, K., Horiguchi, H., Kawaguchi, H., Ohe, K., Fushimi, K. and Tanaka, S. (2013) *Emerg Med J.* Feb 28. [Epub ahead of print]
124. Druschel, C., Schaser, K.D. and Schwab, J.M. (2013) *Spine (Phila Pa 1976)*. Feb 26. [Epub ahead of print]
125. López-Gómez, M., Corona, T., Diaz-Ruiz, A. and Ríos, C. (2011) *Neurol Sci.* 32, 1063-1067.
126. Nader-Kawachi, J., Góngora-Rivera, F., Santos-Zambrano, J., Calzada, P. and Ríos, C.(2007) *Neurol Res.* 29, 331-334.

Semblanza de la Dra Araceli Díaz Ruiz



La Dra. Díaz estudió la Licenciatura en Biología en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, cursó la Maestría en Ciencias (Biología Celular) en la misma Institución y posteriormente se graduó como Doctora en Ciencias Biológicas con Mención Honorífica en el año 2003.

Se ha desempeñado como Profesor de Asignatura de la Facultad de Medicina, en la Universidad Anahuac. Ha impartido cursos en el Posgrado de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Actualmente, es Investigadora en Ciencias Médicas D del Departamento de Neuroquímica, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suarez". Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) nivel II, es Miembro de la Society for Neuroscience, (Marzo de 2003 a la fecha), de la Federation of European Neuroscience Societies (2003 a la fecha) y de la International Society for Neurochemistry (Agosto 2006 a la fecha). La Dra. Díaz, desarrolla diversas líneas de investigación, entre ellas: uso de moléculas y fármacos neuroprotectores en modelos de lesión traumática de la médula espinal e el infarto cerebral, caracterización de los mecanismos fisiopatológicos durante la etapa aguda del daño en dichos padecimientos (estrés oxidativo, excitotoxicidad, inflamación y apoptosis), desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas de la dapsona, administradas por vía oral e intravenosa, caracterización de la farmacocinética y farmacodinamia en animales con lesión de la medula espinal y con infarto cerebral de dicho medicamento. Tiene colaboraciones con diferentes instituciones públicas como la UAM-I, el IMSS y el ININ donde desarrolla diferentes investigaciones relacionadas con su modelo de estudio. Ha publicado más de 20 artículos indexados, con más de 250 citas, ha publicado diversos capítulos de libros y ha participado en más de 90 congresos nacionales e internacionales. Ha graduado a 1 estudiante de Doctorado, 5 de Maestría, 1 de Especialidad y 15 de Licenciatura. Su investigación le ha permitido obtener diferentes patentes y registrar diferentes trabajos aplicados a la clínica.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 109 – 126, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

EL CONTROL EPIGENÉTICO EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS A TRAVÉS DE PcG Y TrxG

EPIGENETIC CONTROL IN PLANT DEVELOPMENT THROUGH TrxG AND PcG

Flores-Sánchez Julio, Petrone-Mendoza Emilio, Steckenborn Stefan Garay-Arroyo Adriana, García Ponce de León Berenice, Álvarez-Buylla Elena y Sánchez María de la Paz.

Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er Circuito Ext. Junto a J. Botánico, Ciudad Universitaria. UNAM. México D.F. 04510, México. Email:mpsanchez@ecologia.unam.mx

Resumen

Los complejos trithorax (TrxG) y Polycomb (PcG) son los principales factores epigenéticos que regulan la expresión génica tanto en animales como en plantas. En *Arabidopsis* la función dinámica de TrxG y PcG provoca cambios en la estructura de la cromatina para controlar varios procesos de su desarrollo. Mientras que TrxG cataliza la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) para mantener la eucromatina; PcG cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) para mantener la heterocromatina. Nuestros datos indican que estos complejos epigenéticos pueden regular diferencialmente las células proliferativas de cultivos celulares respecto a las células proliferativas, pero de la raíz. Así mismo, encontramos que algunos genes que conforman los complejos TrxG y PcG se expresan preferencialmente en los tejidos proliferativos de la raíz. Finalmente, análisis de plantas mutantes indican que se requiere de la función de los genes *TX1*, *CLF* y *LHP1* para un correcto desarrollo radicular.

Palabras clave: *Arabidopsis*, proliferación/diferenciación, epigenética, complejo PcG y TrxG.

Abstract

The trithorax (TrxG) and polycomb (PcG) complexes are major epigenetic factors that regulate gene expression in animals and plants. In *Arabidopsis* the dynamic function of TrxG and PcG can induce a chromatin remodeling that regulate diverse developmental process. Whereas TrxG catalyzes trimethylation of histone H3 at lysine 4 (H3K4me3) to maintain the euchromatin, PcG catalyzes trimethylation of histone H3 at lysine 27 (H3K27me3) to maintain heterochromatin. Our data indicate that these epigenetic complexes can differentially regulate proliferating cells from cell culture than proliferating cells from root tissues. Likewise, we found that some TrxG and PcG genes are preferentially expressed in proliferating root tissues. Finally, analysis of mutant plants indicates an important function of *TX1*, *CLF* and *LHP1* genes during root development.

Keywords: Arabidopsis, proliferation/differentiation, epigenetics TrxG and PcG complex.

Introducción

Durante muchos años se consideró que el fenotipo que presentaban los organismos vivos era un reflejo directo de su material genético, es decir de su contenido de DNA. Actualmente se sabe que existen otros factores como los cambios epigenéticos que intervienen en la generación de un fenotipo. La epigenética es el estudio de los cambios en la estructura de la cromatina que no están ligados a cambios o modificaciones en la secuencias de DNA y que pueden alterar la expresión génica o el metabolismo del DNA. A diferencia de la información genética que es muy estable, los eventos epigenéticos pueden ser reversibles y pueden responder a estímulos endógenos y exógenos (medioambientales). Estos estímulos pueden generar cambios en la metilación del DNA, en las modificaciones post-traduccionales de las histonas o cambios en la formación de RNAs pequeños que regulan la estructura de la cromatina.

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas alteran la estructura de la cromatina debido a que los nucleosomas que la conforman contienen un núcleo de ocho histonas (dos subunidades de histona H2A, H2B, H3 y H4), alrededor del cual se enrolla el DNA (aproximadamente 149pb). A su

vez, la estructura de las histonas contienen un motivo en la región amino terminal de particular importancia debido a que es susceptible a las modificaciones post-traduccionales como metilación, acetilación, ubiquitinación, fosforilación y sumoilación que pueden alterar su estructura y con ello alterar su capacidad de unión con el DNA [1, 2]. En algunos casos, estas modificaciones pueden presentarse en el motivo "histone fold" y en el extremo carboxilo de las histonas [3]. También existen variantes de las histonas (histonas que difieren solo en algunos aminoácidos) implicadas en la remodelación de la cromatina ya que se encuentran enriquecidas en determinados tipos de cromatina [4]. En adición a las modificaciones presentes en las histonas el DNA también puede ser modificado, en especial por la adición de un grupo metilo (CH₃) a residuos de citosinas. En el caso de mamíferos la metilación se da exclusivamente en citosinas que están seguidos de una guanina (CG) [5], mientras que en plantas la metilación puede darse en cualquier contexto (CG, CHG y CHH; donde H puede ser A, C ó T) [6].

Las modificaciones epigenéticas ocurren en residuos específicos de las histonas o del DNA y la combinación de estas modificaciones tiene un impacto en procesos celulares muy importantes como el control de la transcripción, la replicación, la reparación y la recombinación del DNA. De manera general se sabe que una disminución en la metilación del DNA en sus residuos de citosinas, un incremento en acetilación de las histonas H3 y H4 y un incremento en la trimetilación en la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me₃) son marcas asociadas a cromatina abierta o transcripcionalmente activa (eucromatina), mientras que un incremento en la metilación del DNA en sus residuos de citosinas, un decremento en la acetilación de H3 y H4, y un incremento en la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me₃) son marcas asociadas a cromatina compactada o silenciada (heterocromatina).

La maquinaria que se encarga de realizar las modificaciones epigenéticas está compuesta por enzimas como: las metilasas y desmetilasas de DNA; acetilasas (HATs) y desacetilasas (HDACs) de histonas; metiltransferasas

(HMTs) y desmetilasas de las histonas (HDMs); y de otras proteínas accesorias que regulan el reclutamiento de las enzimas a sus sitios blanco o su interacción con otras proteínas [7]. Muchas de estas enzimas forman complejos multiproteicos que se conocen como complejos remodeladores de cromatina y que se requieren para relajar la cromatina mediante la inducción del deslizamiento de los nucleosomas y la formación de asas de cromatina, o para compactar la cromatina mediante la formación de nucleosomas; tal es el caso de los complejos Trithorax (TrxG; Trithorax Group) y Polycomb (PcG; Polycomb Group).

Los complejos TrxG y PcG, regulan la estructura de la cromatina de manera antagónica (Figura 1). El complejo TrxG es el responsable de mantener la eucromatina, mientras que el complejo PcG es el responsable de mantener la heterocromatina (revisado en [8-11]. El complejo TrxG está formado por proteínas que contienen un dominio SET (acrónimo de las proteínas de *Drosophila*: Su(var)3-9 and Enhancer of zeste) por el cual pueden metilar específicamente los residuos de lisina 4 de la histona H3 (H3K4) [12] y por factores remodeladores de la cromatina agrupados en el complejo COMPASS (Complex Protein Associated with Set 1) que ayuda con el reclutamiento o la interacción de las metiltransferasas [13] (Figura 1). En *Arabidopsis* se han descrito dos metiltransferasas del tipo Set-1 con actividad sobre H3K4, llamadas ATX1 y ATX-2 (ARABIDOPSIS TRITHORAX 1-2) [14, 15]. Así mismo se ha descrito un complejo llamado COMPASS-like de plantas que está compuesto por las proteínas WDR5a, ASH2R y RBL (RbBP5) [16] (Tabla I).

El complejo PcG, al igual que los complejos TrxG, también funcionan en complejos multiméricos, los cuáles son denominados Polycomb Repressive Complex 1 y 2 (PRC1 y PRC2; estos nombres se refieren al orden en que fueron descritos y no al orden funcional que siguen durante el silenciamiento de los genes). El complejo PRC2 deposita la marca de K27me3 en la histona H3 para mantener el estado represivo, mientras que el complejo PRC1 reconoce esta marca e induce la ubiquitinación de H2AK119 para estabilizar la represión

(Figura 1) [22].

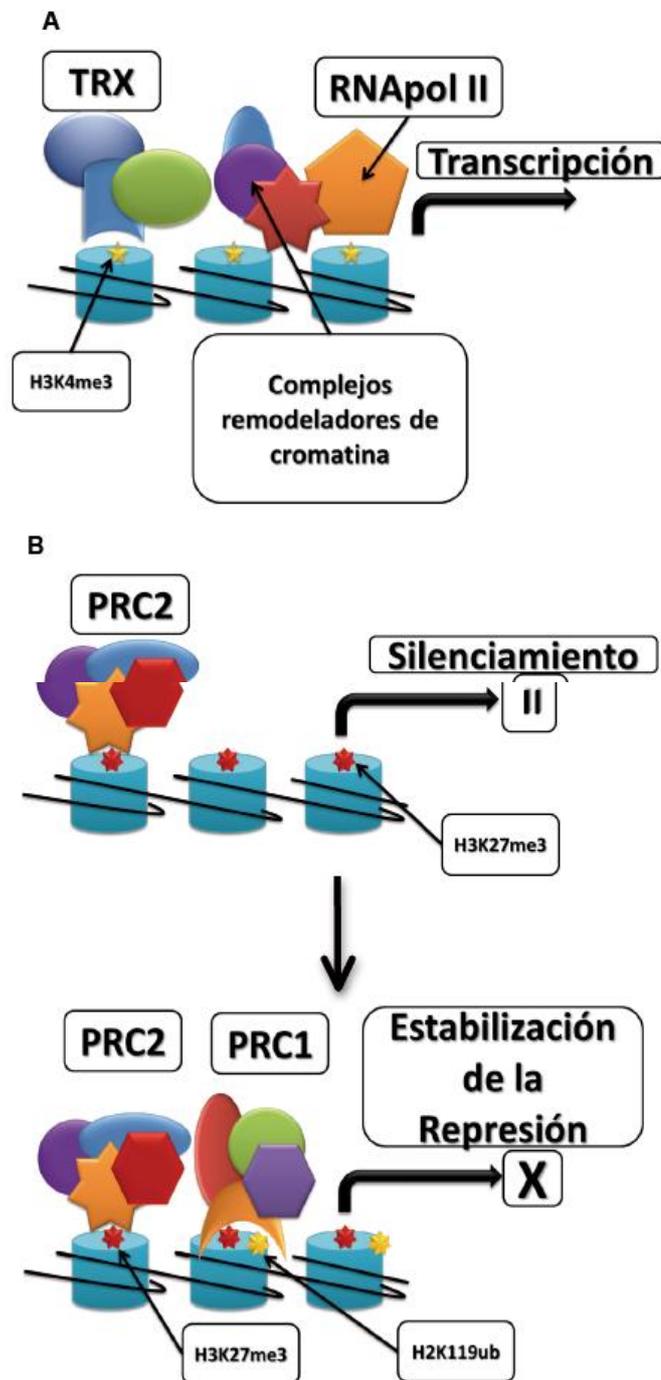


Figura 1. Mecanismo de acción de TrxG y PcG. A) El complejo TrxG pone la marca de H3K4me3, lo que ayuda al reclutamiento de otros factores que permiten una reestructuración de la cromatina para que entre la maquinaria de transcripción. B) El complejo PRC2 deposita la marca represora (H3K27me3), la proteína LHP1 reconoce esta marca y con ayuda de otras proteínas (AtRING o AtBIM1) mantiene la represión.

Complejo	Subunidades de TrxG/PcG	
TrxG		
	HMTs	ATX1 ATX2
	COMPASS	WDR5a ASH2R RBL
PcG		
PRC2	HMTs	MEA, CLF, SWN
	Reguladores	FIS2, FIE, MSI1, VRN2, EMF2
PRC1		LHP1
		AtRING1A, AtRING1B AtBMI1A, AtBMI1B, AtBMI1C

Tabla I. Complejos TrxG y PcG en *Arabidopsis*. TrxG está compuesto por las HMTs ATX1 o ATX2 y por el complejo COMPASS-Like (9,16). Los complejos PRC2 lo conforman las HMTs MEA, CLF o SWN y sus proteínas accesorias (FIS2, FIE, MSI1, VRN2 o EMF2) [9, 17-19]. En *Arabidopsis* aún no se ha caracterizado un complejo PRC1, sin embargo los reportes sugieren que podría estar formado por LHP1 y algunas de las proteínas AtRING o AtBMI1 [20, 21].

PRC2 está compuesto por proteínas Enhancer of Zeste (EhZ), que tiene actividad catalítica de H3K27me3 y por Extra Sex Combs (ESC), p55 y Suppressor of Zeste (Su[z]12), las cuales son necesarias para la actividad enzimática de EhZ (23). En *Arabidopsis* se han descrito tres proteínas tipo EhZ: Medea (MEA), Curly Leaf (CLF) y Swinger (SWN); tres homólogos de Su(z)12: Embryonic Flower 2 (EMF2), Fertilization Independent Seed 2 (FIS2) y Vernalization 2 (VRN2) y Esc y p55 tienen un homólogo cada uno; Fertilization Independent Endosperm (FIE) y Multicopy Suppressor of Ira 1 (MSI1) respectivamente. Estas proteínas forman 3 complejos diferentes: FIS (MEA, FIS2, FIE y MSI1), VRN (CLF/SWN, VRN2, FIE y MSI1) y EMF (CLF/SWN, EMF2, FIE y MSI1) que participan en diferentes procesos del desarrollo (revisado en [9, 17-19]).

El complejo PRC1 está compuesto por Polycomb (PC) una proteína capaz de reconocer la marca depositada por PRC2 y por las proteínas Sex Combs in Midleg (SCM) y dRING que cataliza la ubiquitinación en H2AK119 [24, 25]. *Arabidopsis* no tiene un homólogo de PC; sin embargo, la proteína LHP1 actúa como lectora de la marca H3K27me3 [26, 27]. Así mismo, se han identificado homólogos de las proteínas dRING: AtRING1A, AtRING1B [21], AtBMI1A, AtBMI1B [28] y AtBMI1C [20], hasta el momento se ha descrito la interacción directa entre AtRING1A o AtRING1B con LHP1 [21] y la interacción entre AtRING1A o AtRING1B con AtBMI1C [20]. Estos resultados junto con los análisis genéticos reportados sugieren que el complejo PRC1 de *Arabidopsis* está formado por LHP1 y las proteínas AtRING y AtBIM1.

Tanto en animales como en plantas los complejos TrxG y PcG regulan procesos importantes del desarrollo como la determinación de la identidad celular y la diferenciación celular. En plantas a diferencia de los animales, la organogénesis es un proceso fundamentalmente post-embionario, que les permite mantener la capacidad de generar nuevos órganos a lo largo de todo su ciclo de vida. Esta capacidad regenerativa se debe a la actividad de sus meristemas que contienen un grupo de células tróncas capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular para generar nuevos órganos. El mantenimiento de estas células y su diferenciación requiere de la función dinámica entre los complejos TrxG y PcG, que regulan la activación o represión de genes necesarios o para mantener las células en estado proliferativo o para dirigir su diferenciación. Se ha descrito que ambos complejos regulan activamente procesos de desarrollo floral, de embriogénesis, de desarrollo vegetativo y de invernización (revisado en [9, 17-19]). Sin embargo, se desconoce su participación en procesos celulares como la proliferación y la diferenciación.

Nuestro estudio está enfocado a conocer la función de los complejos TrxG y PcG en los procesos de proliferación y diferenciación celular que se llevan a cabo durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Expresión de los complejos TrxG y PcG en células en proliferación.

La estructura de la cromatina de células en constante proliferación debe ser diferente a la de las células diferenciadas. Las células en proliferación requieren de una cromatina transcripcionalmente activa (eucromatina) que permita la expresión de los genes de ciclo celular y la síntesis de las nuevas cadenas de DNA, y de regiones de heterocromatina o cromatina silenciada para evitar la expresión de genes de diferenciación. Por el contrario en las células diferenciadas la cromatina de los locus de los genes de ciclo celular debe estar silenciada en tanto que las regiones de eucromatina deben estar en los locus de los genes de diferenciación. La participación de TrxG y PcG en esta dinámica de la cromatina ha sido reportada para células de *Drosophila* [29]. En *Arabidopsis* se ha reportado que la marca de H3K4me3 se enriquece en células proliferativas, específicamente en los sitios de iniciación de la replicación y de algunos promotores de genes de ciclo celular [30-31]. Sin embargo, se desconoce la proteína o proteínas responsables de poner esta marca y si existe una función dinámica entre las proteínas que depositan esta marca y las que llevan a cabo la función antagónica. Por ello, nuestro interés es determinar el patrón de expresión y la función de los componentes que forman los complejos TrxG y PcG en células en cultivo, en tejidos con una tasa alta de proliferación y tejidos diferenciados.

El análisis de expresión *in silico* que realizamos con datos de microarreglos hechos a partir de células de *Arabidopsis* MM2D en cultivo y sincronizadas por inanición de sacarosa [32], indicó que la mayoría de los genes del grupo TrxG y PcG se expresan tanto en las células en cultivo como en las células sincronizadas. Sin embargo, esta expresión no tienen un comportamiento cíclico como las ciclinas y otros genes que regulan el ciclo celular (Figura 2). Todos los genes que forman el complejo TrxG se expresan

en alguna etapa del ciclo celular con excepción de *BRL*. Se ha reportado que *BRL* forma parte de TrxG y que participa en la transición a la floración [16] pero se desconoce si *BRL* forma parte del complejo TrxG que participa en otros procesos del desarrollo de la planta; es probable que al igual que PcG, existan diferentes complejos TrxG que participen diferencialmente en cada una de los procesos del desarrollo y que la función de *BRL* sea importante para floración pero no para células en cultivo.

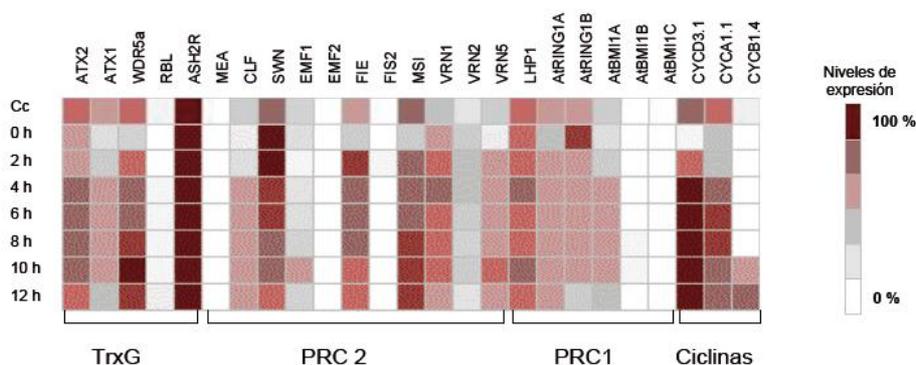


Figura 2. Expresión de los genes que conforman los complejos TrxG y PcG en células en cultivo. Expresión relativa de los componentes de TrxG y PcG en células en cultivo (Cc) o en células sincronizadas por inanición de sacarosa en la fase G1 del ciclo celular (0 h) y células de 2 a 12 h después de la adición de sacarosa. Como control se analizó la expresión de genes del ciclo celular como las ciclinas D, A y B [32]. Datos obtenidos de www.genevestigator.com.

Se han descrito 3 complejos PRC2 que participan en diferentes etapas del desarrollo de *Arabidopsis*, el complejo FIS (*MEA*, *FIS2*, *FIE* y *MSI1*) el VRN (*CLF/SWN*, *VRN2*, *FIE* y *MSI1*) y el complejo EMF (*CLF/SWN*, *EMF2*, *FIE* y *MSI1*) [9, 17-19]. La expresión nula de *MEA* y *FIS2* en células sincronizadas sugiere que el complejo FIS no está activo, en efecto se ha reportado que la función de este complejo es básicamente durante la gametogénesis y embriogénesis (33,34). Igualmente, la ausencia de *EMF2* sugiere que el complejo EMF no está activo en este tipo de células. Por el contrario, la expresión de los genes *VRNs*, al igual que de *CLF*, *SWN*, *LHP1* y de algunos genes *AtRING* y *AtBMI1* sugieren que el complejo VRN podría ser el único complejo activo en células en cultivo; sin embargo, no se puede descartar que exista otro complejo PRC2 no descrito que esté funcionando en este tipo

celular.

Expresión de los complejos TrxG y PcG en raíz

Para estudiar con más detalle la participación de TrxG y PcG en los procesos de proliferación y contrastar estos resultados con datos de células diferenciadas, analizamos la expresión de los genes que conforman ambos complejos en tejido de raíz. La raíz es un órgano que tiene células en proliferación hacia la punta y células diferenciadas hacia la base. Su estructura se ha dividido en tres regiones: Una zona meristemática que conforma el meristemo radicular que contiene la zona de proliferación (con una alta actividad mitótica) y el nicho de células troncales que contiene un organizador central (centro quiescente; CQ). El CQ regenera post-embriónariamente y mantiene indiferenciadas las 4 células iniciales que van a dar lugar a todos los tejidos de la raíz: columela, epidermis, córtex, endodermis, haz vascular y periciclo. Una vez que las células salen de la zona meristemática, atraviesan por una zona de transición en donde las células dejan de proliferar y empiezan a alargarse (entrando a la segunda zona de la raíz que es de alargamiento) para finalmente diferenciarse y conformar la zona de diferenciación (Figura 3A).

Al analizar la expresión de los genes que conforman el complejo TrxG y PcG en la base de datos de un estudio de expresión de cada tipo celular que conforma la raíz [35-36], encontramos que al igual como sucede en células en cultivo, en el CQ solo *MEA* y *FIS2* no se expresan, lo que sugiere que el complejo FIS no participa en el mantenimiento de estas células con baja actividad mitótica (Figura 3B). El resto de los genes que conforman los complejos TrxG y PcG, se expresan en este tipo celular, y de manera interesante encontramos que *MSI1* tiene una expresión muy similar a *SCARECROW (SCR)*, un gen necesario para determinar y mantener la identidad del CQ [37], lo que sugiere que la función de *MSI1* puede ser importante en este tipo celular. Por otra parte, el estudio que realizamos de expresión comparativo entre las células del córtex y la endodermis de la zona meristemática respecto a las mismas células pero de la zona de elongación y

diferenciación, indicó que con excepción de *ATX2*, los demás miembros del complejo TrxG se expresan preferencialmente en las células de la zona meristemática, un comportamiento similar observamos en la mayoría de los genes que forman parte del complejo PcG, con excepción de *MEA* y *VRN1* que se expresan más en tejido diferenciado, y de los genes *EMF1,2*, *FIS2* y *VRN2* cuya expresión es igual en ambos tipos celulares (Figura 3C). Es interesante notar que este patrón se mantuvo cuando se realizaron los mismos análisis con los otros tipos celulares que conforman la raíz (dato no presentado).

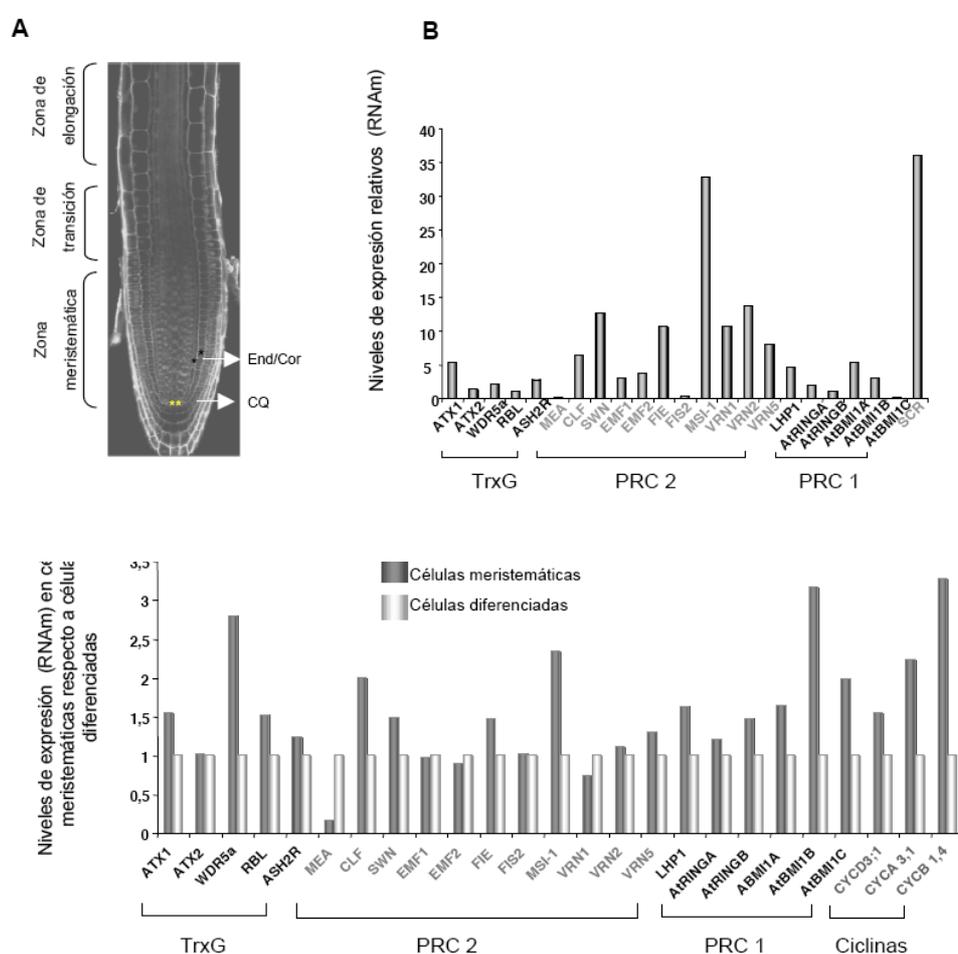


Figura 3. Expresión de los genes que conforman el complejo TrxG y PcG en raíz. A) Arquitectura de la raíz y tipos celulares que la conforman. Los asteriscos claros indican las células del centro quiescente (CQ) y los asteriscos oscuros indican las células del córtex y de la endodermis (End/Cor). **B)** Expresión relativa en células del CQ. **C)** Comparación de los niveles de expresión de los genes en las células del córtex y endodermis de la zona meristemática (proliferativa) con respecto a las mismas células pero de la zona de elongación y diferenciación. Como control se analizó la expresión de tres ciclinas. Datos obtenidos de los análisis realizados por [35-36].

Al comparar los resultados obtenidos en células en cultivo y los obtenidos en células meristemáticas de la raíz, encontramos que los genes *WDR5a* y *MSI1* tiene una alta expresión en los dos tipos celulares, comportamiento que indica que son importantes en la proliferación celular. La posible función de *MSI1* en proliferación es reforzada por el reporte que indica que *MSI1* es regulado por E2F, un factor transcripcional que regula genes del ciclo celular [38]. Por otra parte, *CLF* y *AtBIM1B* se expresan preferencialmente en células meristemáticas de la raíz, a niveles similares a ciclina A; sin embargo, en células en cultivo su expresión es baja o nula para el caso *AtBIM1B*, lo que sugiere que debe de existir una regulación epigenética diferente entre las células en cultivo y las células meristemáticas de la raíz, a pesar de que ambas células son proliferativas.

Función de *ATX1*, *CLF* y *LHP1* en raíz.

La expresión de los genes que forma parte de los complejos TrxG y PcG es indicativo de su función, sin embargo se requiere hacer otro tipo de análisis para determinar si realmente la expresión genética correlaciona con su función. Por ello analizamos líneas mutantes de pérdida de función de un miembro del complejo TrxG como es *atx1* y dos líneas mutantes del complejo PcG; la mutante *clf* que forma parte del complejo PRC2 y la mutante *lhp1* miembro del complejo PRC1. Las mutantes *atx1* y *lhp1* presentan un fenotipo de raíz corta, mientras que las mutantes *clf* son ligeramente más largas respecto a plantas control, este fenotipo concuerda con reportes previos [39] (Figura 4). Se necesitan análisis más detallados para definir su función, pero lo que nos indican estos fenotipos es que es necesaria la función de *ATX1*, *CLF* y *LHP1* para un adecuado desarrollo de la raíz y que seguramente regulan la expresión de genes que dirigen el desarrollo radicular.

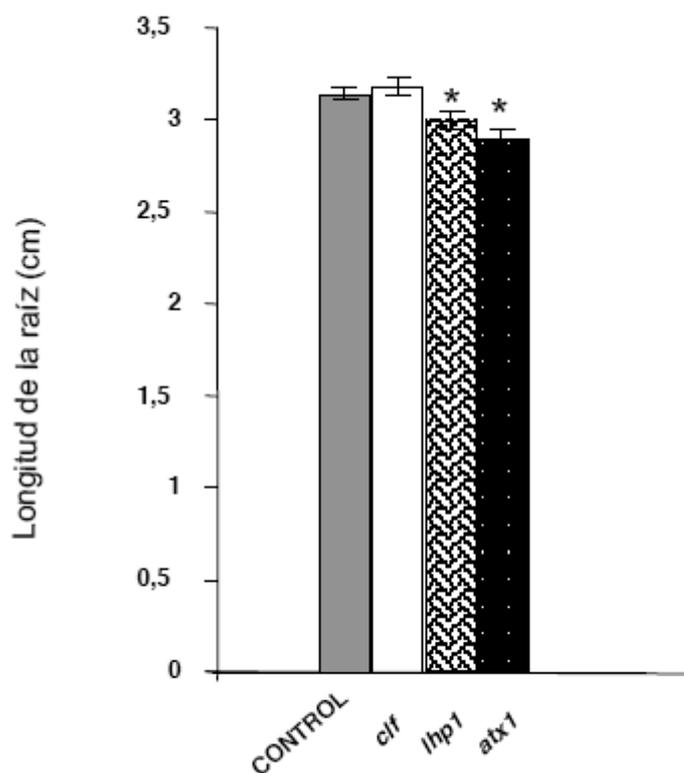


Figura 4. Fenotipo radicular de mutantes *atx1*, *clf* y *lhp1*. Longitud de la raíz que tienen las plantas control y mutantes *atx1*, *clf* y *lhp1* a los 7 días de crecimiento. Datos de 3 réplicas independientes con $n=30$. $6.09663e-05$. *Diferencias significativas.

Hasta ahora se han reportado varios genes que tienen una función muy importante en el desarrollo de la raíz, como son *SCR*, *SHR*, *ACR4*, *CLE40*, *PLT1* y *2*, *JKD*, *LHW*, *APL*, *WER*, *SCM*, *CPC*, *GL2*, *PIN1*, *2*, *3*, *4* y *7*, *SHY2*, *WOX5*, *ARR1* (ver Tabla II [40]); probablemente alguno de estos genes son regulados por TrxG o PcG. Para tener una idea de cuáles de estos genes se regulan por estos complejos se están siguiendo dos tipos de aproximaciones: el estudio de la expresión de los diferentes genes en fondos mutantes de las proteínas TrxG y PcG y el análisis de marcas epigenéticas en las regiones reguladoras de los diferentes genes. Un cambio en expresión génica en las plantas mutantes respecto a plantas control o la presencia de marcas epigenéticas en algunos de los genes indica que, en algún momento del desarrollo de la planta, estos genes son regulados por los complejo TrxG o PcG o por ambos. Al analizar los datos de un epigenoma realizado con plántulas completas de 10-14 días [26] encontramos que los genes *SHR*, *JKD* y

PIN1 tienen la marca que cataliza TrxG (H3K4me3) y la marca que cataliza PcG (H3K27me3). Adicionalmente, analizando los datos de un estudio donde se mapeo la unión de LHP1 a nivel genómico utilizando tejidos de hojas de roseta de 5 semanas de edad (26), encontramos la unión de LHP1 en los locus de estos genes. Otros genes como *SCR*, *WOX5*, *ACR4*, *CLE40*, *PLT1*, *PLT2*, *LWH*, *APL*, *mir166*, *SMB*, *FEZ*, *BRN1*, *BRN2*, *GL2*, *PIN2-4*, *PIN7*, *SHY2*, *ARR1*, *GEM1* y *RBR* sólo presentan alguna de estas marcas (ver tabla II). La presencia de estas marcas indica que en algún momento del desarrollo de la planta, estos genes son regulados por el complejo TrxG o PcG o por ambos, de hecho se sabe que al menos el mutante *clf* tiene desregulados los niveles de expresión de *WOX5* en tejido de raíz. [39]. Será importante determinar cuáles genes son desregulados en nuestros mutantes y conocer las marcas de la cromatina de estos genes durante el desarrollo radicular.

Conclusiones

Los estudios realizados hasta ahora nos indican que TrxG y PcG son importantes para dirigir varios procesos del desarrollo de *Arabidopsis*. Nuestros análisis de expresión sugieren su participación en los procesos de proliferación; sin embargo, el que algunos genes se expresen fuertemente en células en cultivo y con muy baja intensidad en las células meristemáticas de la raíz, o que tengan un comportamiento contrario, sugiere que la regulación epigenética en células en proliferación es diferente en células en cultivo respecto a las células de la raíz, implicando otras serie de factores que pueden estar afectando esta regulación como sería la comunicación intercelular que existe en la raíz. Finalmente, es interesante observar que existe expresión diferencial en algunos de los genes estudiados entre células proliferativas y células diferenciadas, será importante empezar a definir su función para obtener el mecanismo epigenético que se lleva a cabo en ambos tipos celulares.

GEN	H3K4me3	H3K27me3	LHP1	FUNCIÓN
<i>SHR</i>	+	+	+	Regulación de la organización radial de la raíz
<i>SCR</i>	+	-	-	Regulación de la organización radial de la raíz
<i>WOX5</i>	-	+	-	Respuesta a auxinas, regulación de la transcripción
<i>ACR4</i>	+	-	-	Respuesta a citoquininas, regulación de metabolismo de aminoácidos
<i>CLE40</i>	-	+	-	Transducción de señales y especificación del destino celular
<i>PLT1</i>	-	+	+	Especificación del QC y establecimiento del nicho de células madre
<i>PLT2</i>	-	+	-	Especificación del QC y establecimiento del nicho de células madre
<i>JKD</i>	+	+	+	Formación de cortex, epidermis, QC y columella
<i>LHW</i>	+	-	-	Formación de xilema y floema
<i>APL</i>	-	+	+	Organización del floema y diferenciación de vasos
<i>MIR166</i>	+	-	-	Desarrollo vascular
<i>SMB</i>	-	+	-	Desarrollo de cofia
<i>FEZ</i>	-	+	+	Desarrollo de cofia
<i>BRN1</i>	-	+	-	Maduración de células de cofia
<i>BRN2</i>	-	+	-	Maduración de células de cofia
<i>GL2</i>	-	+	-	Determinación de células de epidermis y formación de pelos radiculares
<i>PIN1</i>	+	+	+	Flujo de auxinas en región basal de cilindro vascular
<i>PIN2</i>	-	+	+	Flujo de auxinas en epidermis y cofia lateral
<i>PIN3</i>	+	-	-	Flujo de auxinas en columella, periciclo y en cilindro vascular en la zona de elongación
<i>PIN4</i>	+	-	-	Flujo de auxinas en el meristemo
<i>PIN7</i>	+	-	-	Flujo de auxinas en células provasculares del meristemo y zona de elongación
<i>SHY2</i>	+	-	-	Respuesta a auxinas
<i>ARR1</i>	+	-	-	Señalización de citoquininas
<i>GEM1</i>	+	-	-	Interacción con microtúbulos durante la interfase
<i>RBR</i>	+	-	-	Mantenimiento de células madre

Tabla II. Genes importantes para el desarrollo de la raíz que presentan las marcas de H3K4me3, H3K27me3 o la unión de LHP1. (+) presencia, (-) ausencia de la marca. Datos obtenidos de [26, 41].

Apoyos: CONACyT: 81433, 81542, 167705, 152649, 105678 y DGAPA-UNAM: IN204011-3, IN229009-3, IN226510-3, IB201212

Referencias

1. Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2011) *Cell Res* **21**, 381-395
2. Santos-Rosa, H., and Caldas, C. (2005) *Eur J Cancer* **41**, 2381-2402
3. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) *Nature* **389**, 251-260
4. Ausió, J. (2006) *Brief Funct Genomic Proteomic* **5**, 228-243

5. Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., and Schubeler, D. (2007) *Nat Genet* **39**, 457-466
6. Furner, I. J., and Matzke, M. (2011) *Curr Opin Plant Biol* **14**, 137-141
7. Kouzarides, T. (2007) *Cell* **128**, 693-705
8. Schuettengruber, B., Martinez, A. M., Iovino, N., and Cavalli, G. (2011) *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 799-814
9. Alvarez-Venegas, R. (2010) *Arabidopsis Book* **8**, e0128
10. Simon, J. A., and Tamkun, J. W. (2002) *Curr Opin Genet Dev* **12**, 210-218
11. Bemer, M., and Grossniklaus, U. (2012) *Curr Opin Plant Biol* **15**, 523-529
12. Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000) *Nature* **403**, 41-45
13. Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 1899-1910
14. Saleh, A., Al-Abdallat, A., Ndamukong, I., Alvarez-Venegas, R., and Avramova, Z. (2007) *Nucleic Acids Res* **35**, 6290-6296
15. Saleh, A., Alvarez-Venegas, R., Yilmaz, M., Le, O., Hou, G., Sadler, M., Al-Abdallat, A., Xia, Y., Lu, G., Ladunga, I., and Avramova, Z. (2008) *Plant Cell* **20**, 568-579
16. Jiang, D., Kong, N. C., Gu, X., Li, Z., and He, Y. (2011) *PLoS Genet* **7**, e1001330
17. Schatrowski, N., Creasey, K., Goodrich, J., and Schubert, D. (2008) *Semin Cell Dev Biol* **19**, 547-553
18. Jarillo, J. A., Pineiro, M., Cubas, P., and Martinez-Zapater, J. M. (2009) *Int J Dev Biol* **53**, 1581-1596
19. Pien, S., and Grossniklaus, U. (2007) *Biochim Biophys Acta* **1769**, 375-382
20. Li, W., Wang, Z., Li, J., Yang, H., Cui, S., Wang, X., and Ma, L. (2011) *PLoS One* **6**, e21364
21. Xu, L., and Shen, W. H. (2008) *Curr Biol* **18**, 1966-1971
22. Schuettengruber, B., and Cavalli, G. (2009) *Development* **136**, 3531-3542
23. Lafos, M., and Schubert, D. (2009) *Biol Chem* **390**, 1113-1123
24. de Napoles, M., Mermoud, J. E., Wakao, R., Tang, Y. A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T. B., Silva, J., Otte, A. P., Vidal, M., Koseki, H., and Brockdorff, N. (2004) *Dev Cell* **7**, 663-676
25. Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., and Zhang, Y. (2004) *Nature* **431**, 873-878
26. Zhang, X., Germann, S., Blus, B. J., Khorasanizadeh, S., Gaudin, V., and Jacobsen, S. E. (2007) *Nat Struct Mol Biol* **14**, 869-871
27. Turck, F., Roudier, F., Farrona, S., Martin-Magniette, M. L., Guillaume, E., Buisine, N., Gagnot, S., Martienssen, R. A., Coupland, G., and Colot, V. (2007) *PLoS Genet* **3**, e86
28. Bratzel, F., Lopez-Torrejon, G., Koch, M., Del Pozo, J. C., and Calonje, M. (2010) *Curr Biol* **20**, 1853-1859
29. Medina, R., Ghule, P. N., Cruzat, F., Barutcu, A. R., Montecino, M., Stein, J. L., van Wijnen, A. J., and Stein, G. S. (2012) *Mol Cell Biol* **32**, 3860-3871

30. Costas, C., Sanchez, M. P., Stroud, H., Yu, Y., Oliveros, J. C., Feng, S., Benguria, A., Lopez-Vidriero, I., Zhang, X., Solano, R., Jacobsen, S. E., and Gutierrez, C. (2011) *Nat Struct Mol Biol* **18**, 395-400
31. Sanchez, M. P., and Gutierrez, C. (2009) *Epigenetics* **4**, 205-208
32. Menges, M., Hennig, L., Grisse, W., and Murray, J. A. (2003) *Plant Mol Biol* **53**, 423-442
33. Kohler, C., Hennig, L., Bouveret, R., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., and Grisse, W. (2003) *EMBO J* **22**, 4804-4814
34. Wang, D., Tyson, M. D., Jackson, S. S., and Yadegari, R. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13244-13249
35. Nawy, T., Lee, J. Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Thongrod, S. C., Malamy, J. E., Birnbaum, K., and Benfey, P. N. (2005) *Plant Cell* **17**, 1908-1925
36. Birnbaum, K., Shasha, D. E., Wang, J. Y., Jung, J. W., Lambert, G. M., Galbraith, D. W., and Benfey, P. N. (2003) *Science* **302**, 1956-1960
37. Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B. (2003) *Genes Dev* **17**, 354-358
38. Gutierrez, C. (2009) *Arabidopsis Book* **7**, e0120
39. Aichinger, E., Villar, C. B., Di Mambro, R., Sabatini, S., and Kohler, C. (2011) *Plant Cell* **23**, 1047-1060
40. Petricka, J. J., Winter, C. M., and Benfey, P. N. (2012) *Annu Rev Plant Biol* **63**, 563-590
41. Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y. V., Pellegrini, M., Goodrich, J., and Jacobsen, S. E. (2007) *PLoS Biol* **5**, e129

Semblaza de la Dra María de la Paz Sánchez Jiménez



Dra. Ma De La Paz Sánchez Jiménez realizó sus estudios de licenciatura en la Facultad de química de la UNAM, es QFB. Su tesis de licenciatura la realizó en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Química bajo la dirección del Dr. Jorge Vázquez Ramos, estudiando los procesos bioquímicos que se llevan a cabo

durante el Osmo-acondicionamiento de las semillas de frijol. Posteriormente inició sus estudios de posgrado, también bajo la dirección del Dr Vázquez, pero ahora realizando estudios sobre el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) durante la germinación de maíz.

Al terminar su doctorado, se fue a realizar estudios de post-doctorado en el laboratorio del Dr Crisanto Gutierrez del centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid. Su investigación en ese laboratorio consistió en estudiar la Replicación del DNA en la planta de *Arabidopsis thaliana*, específicamente en estudiar las proteínas del reconocimiento al origen (ORCs) y los sitios de iniciación de la replicación (Orígenes de Replicación).

Actualmente, es Investigador Asociado C de T C del Instituto de Ecología, donde esta realizando estudios sobre la Regulación Epigenética durante el

desarrollo de Arabidopsis. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel 1.

Sus logros se han reflejado en la obtención de becas por parte del CONACYT y becas Europeas como la Short-Term EMBO Fellowship de la organización EMBO, la beca Marie Curie Fellowship de la Fundación Europea Marie Curie y la beca Del Programa “Junta para la Ampliación de Estudios” (JAE) del CSIC de España.

Actualmente tiene 16 artículos publicados, algunos de ellos en revistas de alto impacto como Nature Struct Mol Biol, PNAS, NAR, entre otras.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 140 – 159, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

INHALACIÓN DE MANGANESO COMO MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

MANGANESE INHALATION AS A PARKINSON DISEASE EXPERIMENTAL MODEL

María Rosa Avila Costa¹, José Luis Ordoñez-Librado¹, Verónica Anaya-Martínez¹, Javier Sánchez-Betancourt¹, Ana Luisa Gutiérrez-Valdez¹ y Leonardo Reynoso-Erazo²

¹Laboratorio de Neuromorfología, Departamento de Neurociencias, ²Proyecto de Educación para la Salud, Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación, FES, UNAM, Iztacala. Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. Mex. C.P. 52990

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por un pobre control sobre el movimiento voluntario y disminución progresiva de los niveles de dopamina (DA) en el cerebro. A pesar de los avances para tratar los síntomas de la EP, la mayoría de los pacientes experimentan eventualmente discapacidad permanente. Por lo tanto, la necesidad de estrategias que detengan o disminuyan la progresión de la enfermedad es clara. En este sentido, los modelos animales de la EP son esenciales para la evaluación de terapias adecuadas. Sin embargo, aún cuando la EP fue uno de los primeros trastornos neurológicos modelados en animales, existen limitaciones tales como los cuidados intensivos que requieren los animales después de la administración de ciertas neurotoxinas, recuperación espontánea, falta de alteraciones bilaterales,

cambios bioquímicos y ultraestructurales no específicos, pero principalmente, carecen del curso temporal que se observa en los pacientes. Recientemente en nuestro laboratorio investigamos el efecto de la inhalación de la mezcla de manganeso divalente y trivalente en ratones para obtener un modelo novedoso de la EP, mediante la inducción de la muerte bilateral y progresiva de las neuronas de la Sustancia Nigra compacta. Encontramos que después de 5 meses de inhalación hubo pérdida del 67.58% en el número de neuronas inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa, y que esta pérdida se correlacionaba con alteraciones motoras manifestadas como acinesia, inestabilidad postural y temblor. Más aún, estas alteraciones fueron revertidas con L-DOPA, lo que nos aseguraba que las alteraciones eran de origen dopaminérgico. Posteriormente realizamos el mismo experimento pero con ratas, y obtuvimos resultados muy similares a los encontrados en ratones, por lo que concluimos que la inhalación de la mezcla de compuestos de manganeso es un modelo adecuado para el estudio de la EP, sensible, reproducible y de fácil aplicación, con el cual pretendemos brindar una herramienta más para el estudio de la enfermedad así como la evaluación de nuevos tratamientos.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, modelo experimental, Rata, Ratón, Inhalación de Manganeso

Abstract

Parkinson disease (PD) is characterized by diminished control over voluntary movement and progressive depletion of brain dopamine (DA) levels. Despite the advances to treat the PD symptoms, most of the patients will eventually experience permanent disability. So, the need for strategies that will slow or stop the progression of the disease is clear. In this regard, PD animal models are essential for the evaluation of candidate therapies. However, even when PD was one of the first neurological disorders to have aspects of the disease modeled in non-human animal species, there are inherent limitations such as intensive animal care after neurotoxins administration, spontaneous recovery, lack of bilateral characteristics of advanced PD, biochemical and ultrastructural nonspecific changes, but mainly the time course of the neurodegeneration in humans. Recently in our laboratory, we investigated the effects of divalent and trivalent manganese mixture inhalation on mice to obtain a novel animal model of PD inducing bilateral and progressive Substantia Nigra compacta cell death. We found that after 5 months of inhalation, there was 67.58% decrease in the number of TH-immunopositive neurons and these alterations are correlated with evident deficit in motor performance manifested as akinesia, postural instability and action tremor. More interesting is the fact that these alterations were reverted with L-DOPA treatment, suggesting that the motor alterations induced by the inhalation of the combination of manganese compounds are related to nigrostriatal dopaminergic function, providing new light in the understanding of

manganese neurotoxicity as a suitable PD experimental model. Later on, we did the same experiments in rats, and we found similar results, thus we are contributing to the development of an appropriate PD animal model, sensitive, reproducible, time-efficient and easily applicable behavioral tests.

Keywords: Parkinson disease, Experimental model, Rat, Mouse, Manganese Inhalation

Introducción

En las últimas décadas la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas ha mostrado un incremento. En México, se espera que aumente la proporción de habitantes mayores de 60 años y por consiguiente las enfermedades asociadas a la senectud [1,2]. Según datos obtenidos del INEGI, la cantidad de personas mayores de 60 años en la República Mexicana creció entre el 16 y el 17% por lo que en este contexto se ha propuesto que la tasa de incidencia de las enfermedades neurodegenerativas aumentará de 120 a 230%, siendo la Enfermedad de Parkinson (EP) y las demencias el mayor componente de este incremento [3].

La EP fue descrita por James Parkinson en 1817, en su publicación “*Essay on the shaking palsy*”, como movimientos involuntarios con disminución de la fuerza muscular en segmentos que están en reposo. El paciente con EP desarrolla temblor, rigidez, bradicinesia y alteraciones de los reflejos posturales. Las líneas de la cara del paciente son lisas, su expresión es fija, y casi no hay prueba manifiesta de respuesta emocional espontánea [4].

En 1966 Hornykiewicz analizó cerebros de pacientes con EP y encontró reducción significativa de Dopamina (DA), serotonina y noradrenalina principalmente en el núcleo estriado (NE) y la sustancia nigra (SN), además puntualizó que de las tres aminas biogénicas, la más reducida era la DA [5]. Posteriormente se demostró que las neuronas que estaban degenerando principalmente eran las dopaminérgicas de la porción compacta de la sustancia

nigra (SNc) [6]. De esta forma una de las características más relevantes de la EP es la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc con la consecuente disminución de las concentraciones de DA en el NE [7]. A partir de estos hallazgos se propuso el uso de la L-DOPA como el fármaco sintomático más efectivo en el tratamiento de la EP, ya que es el precursor de la DA [8], además es uno de los criterios empleados en el diagnóstico definitivo de esta enfermedad [9]. De esta manera, desde que se comprendió que las alteraciones observadas en la EP se deben principalmente a la disminución en la concentración de DA en los ganglios basales producto de la degeneración de las neuronas de la SNc se han propuesto diversos modelos animales de degeneración nigral, los cuales permiten estudiar los mecanismos básicos que regulan la función neural o conductual con la finalidad de recrear los eventos que se presentan en esta enfermedad. En la tabla I se presentan algunos de los modelos más utilizados:

Tabla I. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson

Modelo	Características	Desventajas
6-OHDA	Primer modelo establecido, degeneración neuronal en 24 horas Ingresa vía el transportador de dopamina (DAT) e inhibe la cadena respiratoria mitocondrial	Inyección unilateral, modelo agudo.
MPTP	En humanos y monos produce los mismos síntomas/histopatología y respuesta a L-DOPA. Es transformado a MPP+ en la glía y entra por el DAT.	Menor susceptibilidad en roedores, la administración es aguda o subaguda. En roedores hay recuperación
Rotenona	Daño en la SNc e inclusiones citoplasmáticas parecidas a cuerpos de Lewy. Inhibición de cadena respiratoria mitocondrial.	Selectividad neuronal, no todos los animales se afectan.

Como se puede observar, existen diferentes modelos animales para el estudio de la EP, todos ellos con ventajas y desventajas, sin embargo, hasta el momento no existe un modelo que simule el curso temporal de la enfermedad que se observa en humanos. Se ha propuesto que un modelo ideal de la EP es aquel capaz de reproducir los signos clínicos observados en humanos [10] y el déficit neuroquímico asociado a la degeneración patológica de las células dopaminérgicas de la SNc, incluyendo el curso temporal [11].

Se han investigado los efectos del Manganeso (Mn) como un posible modelo de EP debido a que su toxicidad (conocida inicialmente como manganismo) comparte algunos síntomas neurológicos con la EP [12,13]. Se pueden distinguir tres fases clínicas en el desarrollo de la neurotoxicidad crónica por Mn, pero es en la fase tardía (o de establecimiento) donde se observan alteraciones extrapiramidales que incluyen rigidez muscular, hipocinesia y temblor de las extremidades superiores [14]. Se ha establecido que estos signos están asociados con disfunción dopaminérgica dentro de los ganglios basales [15] y aunque se ha propuesto que el sitio de lesión neurológica primaria es el Globo Pálido (GP), se han acumulado algunas evidencias que sugieren que la toxicidad del Mn puede causar daño a la SNc [16]. Los estudios sobre las consecuencias neurobiológicas de la toxicidad del Mn realizados en las últimas dos décadas se han enfocado principalmente a los efectos del Mn sobre el metabolismo de la DA y las alteraciones conductuales asociadas a éste. Sin embargo, hay reportes contradictorios acerca del efecto del Mn dentro de los ganglios basales, incluyendo disminución, incremento o ningún cambio en las concentraciones de DA. Schneider et al. [17] reportaron que monos expuestos a sulfato de Mn (10–15mg/Kg/semana) por 272 días, no presentan disminución en las concentraciones de DA en el estriado, por lo que estos autores consideran que el sistema nigroestriatal no se altera. Por otra parte, algunos autores han demostrado que la exposición aguda a Mn está asociada con el incremento de DA, lo anterior se manifiesta por hiperactividad [18]. En contraste, Ponzoni et al.

[19] demostraron que la inyección unilateral de cloruro de manganeso en la SNc de ratas reduce las concentraciones de DA y el número de neuronas inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa (TH).

Los resultados contradictorios sobre los efectos dopaminérgicos del Mn posiblemente reflejan que hay diferencias en la vía de exposición, edad de los animales de experimentación, duración, concentración de Mn o compuesto utilizado entre los estudios, aunque también demuestran la gran complejidad de la toxicidad de Mn y sugieren que los factores que contribuyen a su toxicidad no están bien entendidos. De esta manera, parece que en dosis bajas, el Mn aumenta la DA y los niveles de sus metabolitos, mientras que el efecto contrario se ha observado en dosis más altas [20, 21]. Asimismo, se ha sugerido que concentraciones mayores de Mn pueden acelerar significativamente la oxidación de DA y otras catecolaminas, lo anterior amplifica la formación de especies reactivas de oxígeno [22, 23].

Existen reportes de que el Mn se encuentra en diferentes estados de oxidación [24, 25, 26]. En humanos y animales está principalmente en los estados divalente (Mn^{2+}) y trivalente (Mn^{3+}) [25], siendo el Mn^{2+} la forma predominante [26]. Se ha demostrado que en la mitocondria el Mn inhibe el complejo I alterando la fosforilación oxidativa; al parecer el Mn^{3+} es más potente inhibiendo el complejo I que el Mn^{2+} [25]. A este respecto, y de acuerdo con HaMai y Bondy [27], la actividad prooxidante del Mn^{2+} es dependiente de las concentraciones de Mn^{3+} , quien podría facilitar que una pequeña porción de Mn^{2+} se oxide a Mn^{3+} . Esta relación sinérgica entre el Mn^{2+} y el Mn^{3+} resulta en un ciclo redox continuo. Más aún, se ha propuesto que aún cuando el Mn^{+2} no tiene propiedades oxidantes intrínsecas, la presencia de Mn^{+3} en cantidades traza es suficiente para promover la formación de radicales libres y quinonas tóxicas producto de la auto-oxidación de la DA mediada por el Mn [27]. Estos hallazgos nos llevaron a considerar la hipótesis de que si los animales son

expuestos a la mezcla de Mn^{2+} y Mn^{3+} , es posible que encontremos alteraciones celulares y conductuales similares a las observadas en la EP.

Ahora bien, ya que se ha postulado que el Mn^{3+} es más potente para producir estrés oxidativo y que el Mn^{2+} necesita la presencia de Mn^{3+} para llegar a la oxidación, y que existe una sinergia entre los dos compuestos, el presente estudio investiga el efecto de la inhalación de la mezcla de Mn^{2+}/Mn^{3+} , con el fin de obtener un modelo novedoso de EP produciendo muerte neuronal bilateral y progresiva en la SNc, correlacionando dicha muerte celular con alteraciones motoras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ratones: Los experimentos se llevaron a cabo con ratones macho de la cepa CD1 con peso inicial de 33 ± 2 g, los cuales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad 12:12, con agua y alimentación *ad libitum* (salvo los días de evaluación en la prueba de “*reaching task*”). Antes de la exposición a Mn los animales fueron entrenados para las pruebas de coordinación motora durante una semana:

Conducta Motora

Para evaluar la coordinación motora se utilizó la prueba de la viga. Todos los animales fueron entrenados durante una semana en un aparato de madera con dos pedestales a los cuales va unida una viga de madera de 1m (ratón) 2m (rata) de largo, elevada del suelo, con inclinación de 15° , la cual tiene un grosor de 3 mm (ratón) y 12 mm (rata). Se registró con un cronómetro el tiempo en que los animales tardaron en atravesar la viga (tiempo total).

Paralelo al entrenamiento en la viga, se entrenó a los animales en la prueba motora fina “*reaching task*” empleando una caja de acrílico, la cual tiene al frente una abertura de 1 cm por la cual el animal tenía que alcanzar un pellet y comerlo

utilizando el miembro preferente; se contaban como aciertos cada vez que el animal tomaba el trozo de alimento y lo llevaba hasta su boca y como error si se le caía o no lo podía sujetar. A cada animal se le dieron 10 oportunidades, es decir, tuvieron 20 pellets disponibles. La evaluación en ambas pruebas se realizó periódicamente, una vez por semana durante 5 meses (20 semanas de inhalación de la mezcla de Mn).

Posteriormente se formaron dos grupos: un grupo fue expuesto a agua desionizada (grupo control; n= 20), mientras que el segundo grupo (n= 20) fue expuesto a la mezcla de Cloruro ($MnCl_2$) 0.04 M y acetato ($Mn(OAc)_3$) 0.02 M de Mn por vía inhalada en una caja de acrílico, 1 hora, dos veces por semana. Con base a los resultados obtenidos en las evaluaciones conductuales se determinó sacrificar a todos los animales después de haber sido expuestos a 40 inhalaciones (cinco meses de exposición) bajo anestesia profunda con Pentobarbital sódico dosis letal i.p. (0.2 mg), posteriormente los ratones se perfundieron vía aorta con solución salina isotónica al 0.9% y se fijó el tejido con una mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído al 2% en amortiguador de cacodilato al 0.1 M pH 7.4. Una vez perfundidos, se extrajeron los cerebros y se colocaron en el mismo fijador por dos horas, posteriormente se hicieron cortes histológicos a los cuales se les realizaron inmunomarcajes: para determinar el número de neuronas dopaminérgicas se realizó inmunohistoquímica anti-TH a cortes del mesencéfalo (SNc y el área ventral tegmental [VTA]); para evaluar la especificidad de la neurotoxicidad de la mezcla de Mn se realizó el conteo de neuronas a través de inmunohistoquímica anti-NeuN en el NE, GP, Corteza motora primaria y corteza frontal, áreas CA1 y CA3 del hipocampo y la corteza cerebelosa.

A otro grupo de animales después de 40 inhalaciones, se les administró L-DOPA (15 mg/Kg), durante dos meses; cada semana se evaluó la coordinación motora hasta finalizar el tratamiento. Por otra parte, a las 40 inhalaciones se obtuvo el

tejido fresco de otros 10 animales control y 10 expuestos para determinar las concentraciones de DA y sus metabolitos mediante HPLC en el NE, SNc y GP.

Ratas: Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 180 gramos que fueron mantenidas en ciclos luz oscuridad 12:12, con libre acceso al agua/comida (salvo los días de evaluación en la prueba de “reaching task”). Las ratas fueron sometidas a los mismos entrenamientos y evaluaciones conductuales que los ratones, pero a diferencia de éstos, las ratas inhalaron tres veces a la semana por seis meses, con las mismas concentraciones de $MnCl_2/AcMn_3$. Se llevaron a cabo las mismas técnicas inmunohistoquímicas y también se les trató con L-DOPA después de seis meses de inhalación.

Resultados y Discusión

Dentro de las características de la EP se encuentra el déficit motor, para estudiar este aspecto se evaluó en la viga de equilibrio a los animales de todos los grupos. En la figura 1A se observa que el tiempo promedio que tardaron los ratones control en atravesar la viga fue de 8 segundos, mientras que los ratones expuestos a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ a partir de la décima y hasta la cuadragésima inhalación mostraron aumento en el tiempo de realización de la prueba. Con la administración de L-DOPA, a las 40 inhalaciones, los animales expuestos a Mn mostraron disminución significativa en el tiempo en el cual recorrieron la viga alcanzando los tiempos registrados por los animales del grupo control. En cuanto a las ratas, en la prueba de la viga se hace evidente el aumento en el tiempo de ejecución en los animales expuestos a la mezcla de Mn. Mientras que los animales del grupo control mantienen un promedio de 20 segundos durante todo el experimento, los animales expuestos tardan en trasladarse por la viga más de 120 segundos a partir de la décima semana (figura 1B). Este efecto se revierte por completo con el tratamiento con L-DOPA. Además del tiempo, tanto los ratones como las ratas que inhalaron Mn presentaron dificultad para iniciar el movimiento, rigidez y temblor antes del tratamiento con L-DOPA.

Posteriormente se evaluó la coordinación motora (reaching task) mediante el conteo de aciertos y errores. Como se observa en la figura 2A, en promedio los ratones control obtuvieron 13 aciertos durante todo el periodo de evaluación, mientras que los ratones expuestos a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ a partir de la vigésima y hasta la cuadragésima inhalación mostraron disminución significativa en el número de aciertos. A partir de la cuadragésima inhalación, cuando se les administró L-DOPA mostraron recuperación en esta tarea casi a nivel de los animales del grupo control. Asimismo, se observó que las ratas tratadas con la mezcla de Mn muestran disminución significativa en el número de pellets tomados correctamente conforme aumenta el número de inhalaciones a diferencia del grupo control (figura 2B). Al igual que en los ratones, las alteraciones mejoraron notablemente con L-DOPA.

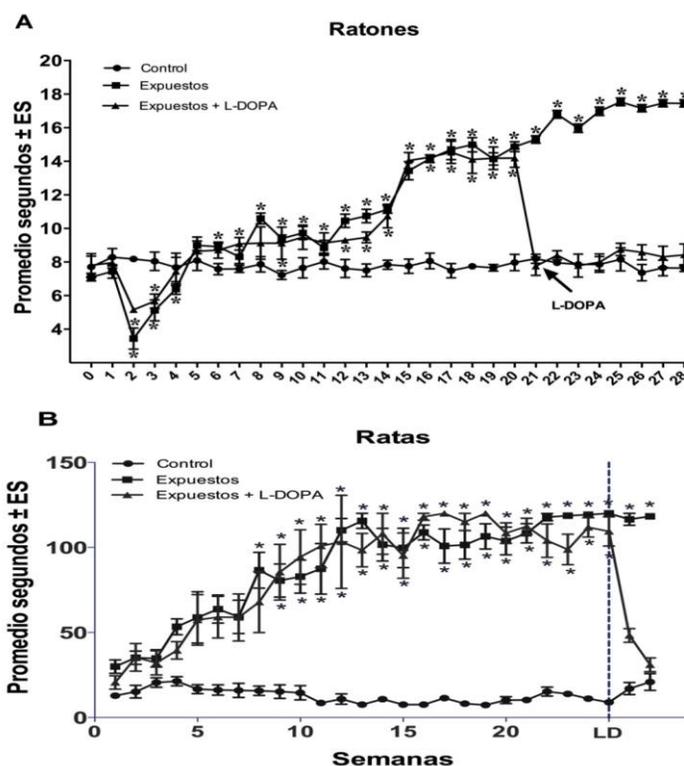


Figura 1. Media del tiempo en segundos que tardaban en recorrer la viga los ratones (A) y las ratas (B) de los grupos control así como los expuestos a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ y tratados con L-DOPA (LD). ANOVA * = $P < 0.05$ vs grupo control.

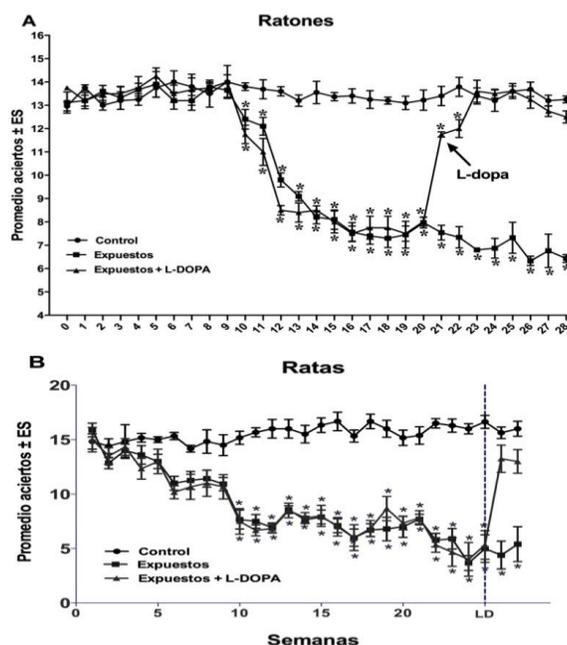


Figura 2. Media del número de aciertos tanto de los ratones (A) como de las ratas (B) de los grupos control así como de los animales expuestos a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ y tratados con L-DOPA (LD). ANOVA * = $P < 0.05$ vs grupo control.

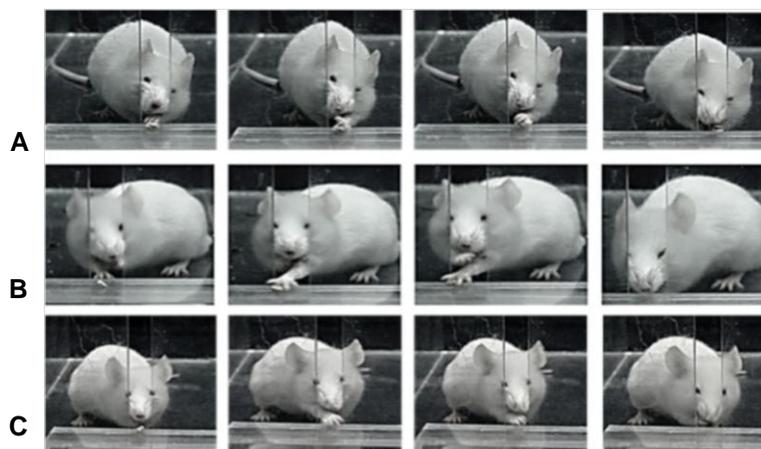


Figura 3.- En el panel A se puede observar la serie de movimientos realizados por los animales del grupo control, en donde se aprecia que el movimiento de la extremidad anterior es dirigido específicamente al pellet, con los dígitos cerrados para sólo abrirlos al momento en que va a tomar la comida. En la serie B se aprecia como en los animales expuestos a la mezcla de Mn, los movimientos son deficientes, ya que no sujetan la comida, sino que la arrastran al interior de la caja con los dedos abiertos todo el tiempo. En la serie C los animales expuestos que recibieron L-DOPA son capaces de realizar nuevamente dichos movimientos de manera adecuada.

Adicionalmente se llevó a cabo el análisis cualitativo de los movimientos durante la ejecución de la prueba de reaching task. Esta prueba implica la realización de una secuencia de movimientos, se inicia a partir de que los animales huelen el trozo de alimento en la parte delantera de la caja de evaluación, levantan el miembro anterior, ajustan la postura para proyectar la extremidad hacia el pellet y lo sujetan, finalmente el movimiento culmina con el regreso del miembro y la presentación del alimento ante la boca e introducirlo a la misma. Como lo muestra la figura 3, los animales del grupo control (serie A) mostraron todo este conjunto de movimientos; contrario a ello, en los animales expuestos a Mn (serie B) se observó que el ajuste de la postura es deficiente, ya que no se alinean hacia la abertura de la caja, al proyectar la extremidad, los dígitos están abiertos sin sujeción del alimento, en lugar de ello lo jalan al interior de la caja para posteriormente tomarlo del piso con la boca. En contraste con esto, los animales expuestos a Mn que recibieron L-DOPA (serie C) se observa mejoría significativa en la ejecución de la tarea, ya que son capaces de realizar todos los movimientos necesarios para la presentación del alimento en la boca.

Como se observa en nuestros resultados (figura 1) los animales expuestos a la mezcla de Mn incrementaron el tiempo en la realización de la prueba de la viga conforme transcurría el número de inhalaciones. Datos similares fueron observados en modelos en los cuales hay disminución de DA; por ejemplo en ratones C57 BL6/J a los cuales se les administró MPTP, se observaron alteraciones en la coordinación de las extremidades y disminución en la longitud de la zancada [28], hechos que se relacionan con nuestros resultados, sin embargo las alteraciones motoras reportadas con MPTP son contradictorias, en el modelo de MPTP en ratones se ha reportado recuperación espontánea mientras en el modelo transgénico hay pérdida de neuronas en el VTA [29].

La prueba de “reaching task” ha sido ampliamente utilizada para evaluar la función de los ganglios basales [30]. Mediante esta prueba se examina tanto

la habilidad para retirar pellets, así como la exactitud para hacerlo, la precisión de los movimientos de los miembros superiores tales como el alcance y la sujeción muestran componentes motores muy similares entre humanos y ratones, lo cual sugiere homología [31], ya que los pacientes con EP experimentan dificultad para la ejecución de tareas que requieren movimientos secuenciales unilaterales o bilaterales de los brazos, o bien actividades que alternen el movimiento de las diferentes extremidades y los movimientos realizados por los segmentos corporales distales están más afectados que los movimientos realizados por los segmentos corporales proximales [31]; por ello esta prueba es muy útil para conocer si el déficit motor en los modelos animales está relacionado con la depleción de DA [30]. Las alteraciones motoras que encontramos indican daño en la función de los ganglios basales responsables de estos movimientos [32].

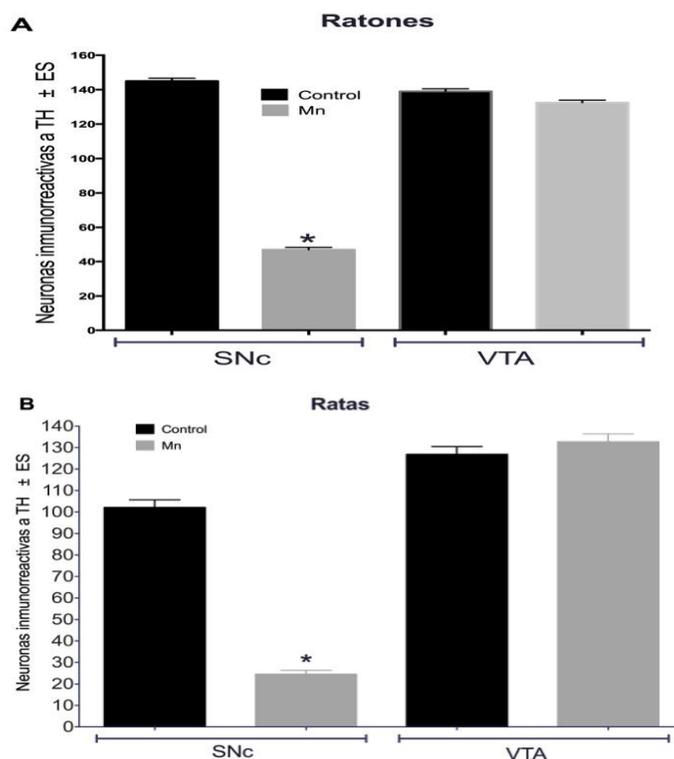


Figura 4. Número promedio de neuronas dopaminérgicas de la SNc y el VTA en ratones (A) y ratas (B); para calcular el porcentaje de pérdida se tomó la media del grupo control como el 100%. El conteo de las neuronas se realizó en un área de $1500 \mu\text{m}^2$ dentro de la SNc y en $3300 \mu\text{m}^2$ en el VTA. Prueba de * = $P < 0.001$ vs grupo control.

En cuanto a la inmunohistoquímica para TH, los ratones expuestos a 40 inhalaciones mostraron disminución del 67.58% en el número de neuronas inmunopositivas a TH en la SNc respecto a los animales del grupo control, mientras que no hubo pérdida de neuronas en el VTA de los animales expuestos a $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$ comparados con los controles (Figura 4A y 5). Las ratas presentaron una pérdida del 75.9% en el número de neuronas inmunorreactivas a TH después de 48 inhalaciones y, al igual que los ratones, no presentaron pérdida de neuronas en el VTA (Figura 4B).

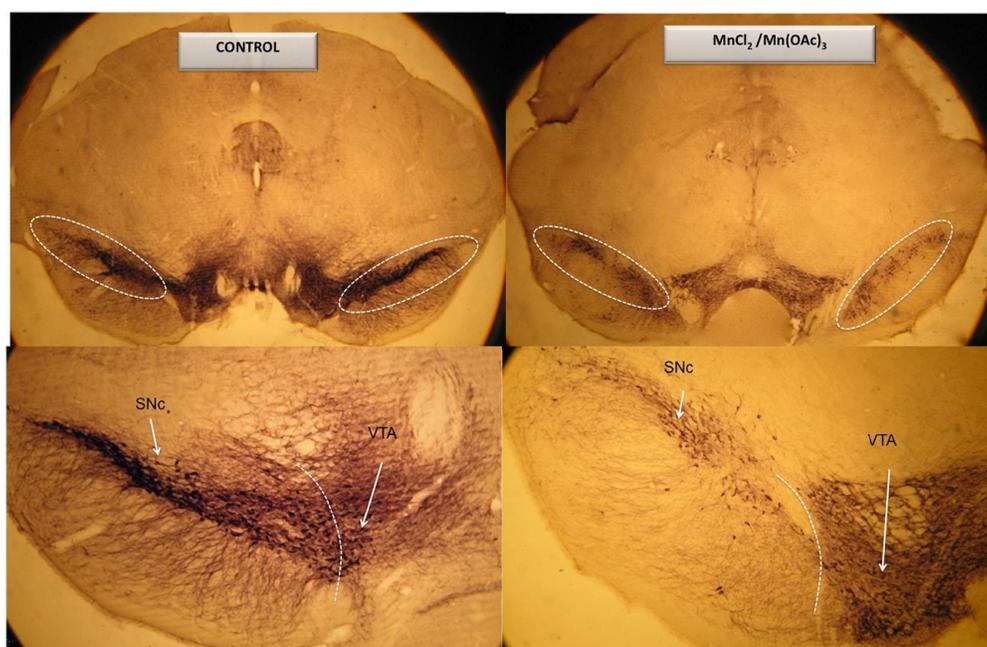


Figura 5. Cortes coronales representativos a nivel del mesencéfalo de ambos grupos donde se puede observar la pérdida de neuronas en la SNc de los animales expuestos a Mn en comparación con los animales del grupo control; no se observa diferencia en la marca dentro del VTA.

Por otra parte, una de las características que deben tener los modelos animales es la especificidad por los núcleos que se ven afectados en humanos, por lo que para determinar si la mezcla de Mn afecta otras estructuras

cerebrales se realizó inmunohistoquímica anti NeuN, una proteína nuclear específica de las neuronas. A este respecto, no encontramos pérdida significativa en el número de neuronas en ninguno de los núcleos analizados (datos no mostrados).

En cuanto a la disminución en las concentraciones de DA y sus metabolitos en ratones encontramos que en el NE, GP y la SNc se registró pérdida significativa del 73%, 68% y 87% de DA, respectivamente; 52% 61% y 85% de DOPAC, respectivamente y 58%, 46% y 56% de HVA, respectivamente (Figura 6).

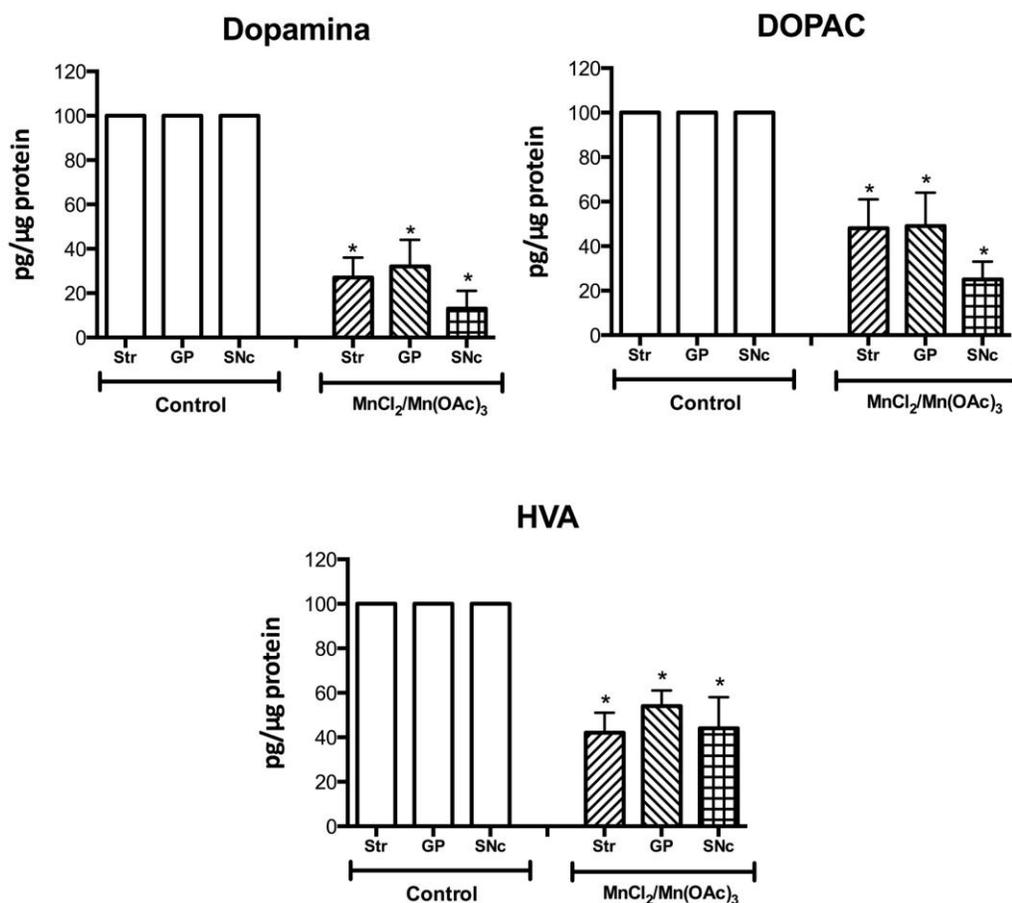


Figura 6. Contenido de DA, DOPAC y HVA en el núcleo estriado (Str) globo pálido (GP) y sustancia nigra compacta (SNc) de los ratones del grupo expuesto a 40 inhalaciones de MnCl₂/Mn(OAc)₃ comparados con el grupo control. * = P < 0.001 vs grupo control

La pérdida de neuronas en la SNc, disminución de DA y sus metabolitos en los ganglios basales y la respuesta inmediata a la L-DOPA corroboran que las alteraciones son debidas al desbalance en el sistema dopaminérgico dentro de los ganglios basales; aunado a estos resultados, descartamos que el déficit motor mencionado pudiera estar relacionado a la alteración de los mecanismos sensoriales de ciertas zonas de la corteza motora involucradas en esta actividad. De acuerdo a los datos obtenidos a través del conteo celular en el VTA y en la corteza motora primaria y corteza frontal se demuestra que no hubo cambios importantes en estos núcleos, por lo que suponemos están intactos ya que no se ve pérdida aparente de neuronas en estas áreas después de la exposición a Mn, aunado a ello los resultados de la prueba de la viga son sensibles a las alteraciones en la vía nigroestriatal [33].

Varios estudios han demostrado que el Mn se acumula en los ganglios basales, particularmente en el GP, el NE y la SNc en donde causa neurodegeneración; la exposición crónica a Mn puede inducir alteraciones similares a la EP [34]. Los pacientes con esta enfermedad presentan rigidez, temblor, acinesia y alteraciones de la postura. Estos signos, son el reflejo de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc [3]. En esta enfermedad hay un umbral, en donde los síntomas motores aparecen cuando la depleción de DA en el estriado es de alrededor del 80% y cuando aproximadamente el 60% de las neuronas dopaminérgicas de la SNc se han perdido [35]. Esto concuerda con nuestros resultados, los cuales muestran que después de la inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ hay disminución del 63% (en ratones) y del 75% (en ratas) en el número de neuronas TH-positivas de la SNc y disminución en los contenidos de DA en los núcleos estudiados, lo cual podría explicar las alteraciones motoras observadas en las evaluaciones conductuales.

Con respecto de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas se han propuesto varias teorías acerca de cómo el Mn puede provocar daño a estas

células. Se ha establecido que el Mn tiene acceso a las neuronas dopaminérgicas a través del sistema del DAT [12, 36, 37] e intracelularmente se acumula dentro de la mitocondria vía el canal uniporte de Ca^{2+} [38, 39], en donde inhibe el complejo I propiciando la formación de radicales libres, principalmente O_2^- [40]. Por otra parte, el hecho de que las neuronas del VTA no se vieran afectadas es probablemente debido a que como se mencionó, el Mn es transportado al interior de las células mediante el DAT, en el VTA las neuronas dopaminérgicas, cuyos cuerpos neuronales son adyacentes a la SNc, son mucho menos afectadas en la EP [41] ya que se ha propuesto que en la corteza prefrontal, el sitio primario de proyección de estas neuronas, la recaptura y catabolismo de la DA, al parecer depende más de otros transportadores monoaminérgicos y enzimas como la catecol-O-metiltransferasa que del DAT, mientras que en el NE el mecanismo de “limpieza” de DA del espacio sináptico parece depender principalmente de este transportador.

Ahora bien, en nuestros resultados observamos pérdida significativa de DA y sus metabolitos en los tres núcleos evaluados de los animales expuestos a Mn en comparación con los animales del grupo control. Estas observaciones demuestran que el sistema dopaminérgico es un blanco importante para la toxicidad del Mn. De acuerdo a lo anterior se ha reportado que personas expuestas a Mn, la concentración de DA estriatal se redujo notablemente [42]. Por su parte, los modelos para el estudio de la EP, dentro de sus características neuropatológicas incluyen reducción de DA estriatal y sus metabolitos [43].

En conclusión, los datos obtenidos en el presente trabajo ofrecen evidencias de que los déficit funcionales producidos por la inhalación de Mn en ratones y en ratas son cuantificables y están relacionados con la función dopaminérgica nigroestriatal. Las diferencias neuroquímicas encontradas aquí son probablemente debidas a la combinación de $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$, ya que se ha informado que el Mn^{3+} es más potente para producir estrés oxidativo y daño

celular y el Mn^{2+} necesita la presencia del Mn^{3+} para llegar a la oxidación, y que existe una sinergia entre los dos estados de oxidación del Mn, y hasta el momento, no hay ninguna investigación que haya incluido esta mezcla. Por lo tanto, consideramos que la inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ es un modelo confiable, reproducible, bilateral y que sigue un curso temporal similar al que se observa en la EP.

Agradecimientos. Este proyecto ha sido apoyado por PAPIIT-DGAPA UNAM IN220111 y PAPCA–Iztacala UNAM- 2013.

Referencias

1. Góngora_Alfaro, J.L., Moo-Puci, R.E., Villanueva-Toledo, J., Arankowsky-Sandoval, G., Álvarez-Cervera, F.J., Pineda-Cortés, J.C., Heredia-López, F.J. y Bata-García, J.L. (2005) **Revista Biomédica** 16, 99-111.
2. Reynoso-Erazo, L. (2011). En: Héctor Martínez, Juan José Irigoyen, Felipe Cabrera, Julio Varela, Pablo Covarrubias y Angel Jiménez (eds). Estudios sobre comportamiento y aplicaciones Vol II. México: SINCA-COECYTJAL.
3. Otero-Siliceo, E., Abascal-Arias, M.R. y Alanís-Quiroga, M. (1996) **Fondo de Cultura Económica**. México D.F.
4. Tolosa, E., Wenning, G. y Poewe, W. (2006) **Lancet Neurol.** 5, 75–86.
5. Hornykiewicz, O. (1993) **Adv. Neurol.** 60, 140-147.
6. Gibb, W.R.G. y Less, A.J. (1991) **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.** 54, 388-396.
7. Bové, J., Prou, D., Perier, C. y Przedborski, S. (2005) **NeuroRx.** 2, 484-494.
8. Barbeau, A. (1981) En: *Parkinson's disease: current progress, problems and management*. Rinne, V.K; Klinger, M. Stamm, G. (eds.) Elsevier, Amsterdam, 229-239.
9. Gelb, D.J, Oliver, E. y Gilman, S. (1999) **Arch. Neurol.** 56, 33-39.
10. Hirsch, E.C. (2006) **J. Neural Transm. Suppl.** 70, 255-260.
11. Emborg, M.E. (2004) **J. Neurosci. Methods.** 139, 121-143.
12. Calne, D.B., Chu, N.S., Huang, C.C., Lu, C.S. y Olanow, W. (1994) 44,1583-1586.
13. Cook, D.G., Fahn, S. y Brait, K.A. (1974). **Arch. Neurol.** 30, 59-64.
14. Guilarte, T.R. (2010) **Environ Health Perspect.** 118, 1071-1080.
15. Tapin, D., Kennedy G. y Zayed, J. (2006) **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 211, 166-174.
16. Chun, H.S., Lee, H. y Son, J.H. (2001) **Neurosci. Lett.** 316, 5-8.
17. Schneider, J.S., Decamp, E., Koser, A.J., Fritz, S., Gonczi, H., Syversen, T., et al. (2006) **Brain Res.** 1118, 222-231.

18. Salehi, F., Krewski, D., Mergler, D., Normandin, L., Kennedy, G., Philippe, S., et al. (2003) **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 191, 264-271.
19. Ponzoni, S., Guimarães, F.S., del Bel, E.A. y Garcia-Cairasco, N. (2000) **Biol. Psychiatry.** 24, 307-325.
20. Chandra, S.V. y Shukla, G.S. (1981) **J. Neurochem.** 36, 683-687.
21. Desole, M.S., Esposito, G., Migheli, R., Fresu, L., Sircana, S., Miele, M., et al. (1995) **Neurosci. Lett.** 192, 73-76.
22. Donaldson, J., McGregor, D. y LaBella, F. (1982) **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 60, 1398-1405.
23. Sloot, W.N., Korf, J., Koster, J.F., de Wit, L.E. y Gramsbergen, J.B. (1996) **Exp. Neurol.** 138, 236-245.
24. Salehi, F., Normandin, L., Krewski, D., Kennedy, G., Philippe, S. y Zayed, J. (2006) **J. Appl. Toxicol.** 26, 419 – 426.
25. Archibald, F.S. y Tyree, C. (1987) **Arch. Biochem. Biophys.** 256, 638-650.
26. Aschner, M., Erikson, K.M. y Dorman, D.C. (2005) **Crit. Rev. Toxicol.** 35, 1-32.
27. HaMai, D. y Bondy, S.C. (2004) **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1012, 129-141.
28. Fernagut, P.O., Diguët, E., Labattu, B. y Tison, F. (2002) **J. Neurosci. Methods.** 113, 123-130.
29. Van den Munckhof, P., Luk K.C., Ste-Marie, L., Montgomery, J., Blanchet, P.J., Sadikot, A.F. y Drouin, J. (2003) **Development.** 130, 2535-2542.
30. Wishaw, Q., Zeeb, F., Erickson, C. y McDonald, J. (2007) **Neuroscience.** 146, 86-97.
31. Wishaw, I.Q., Suchowersky, O., Davis, L., Sarna, J., Metz, G.A. y Pellis, S.M. (2002) **Behav. Brain. Res.** 133, 165-176.
32. MacLellan, C.L., Gyawali, S. y Colbourne, F. (2006) **Behav. Brain Res.** 175, 82-89.
33. García-Hernández, F., Pacheco-Cano, M.T. y Drucker-Colín, R. (1993) **Physiol. Behav.** 54, 589-598.
34. Vezer, T., Kurunczi, A., Naray, M., Papp, A. y Nagymajtenyi, L. (2007) **Am. J. Ind. Med.** 50, 841-852. Dauer, W. y Przedborski, S. (2003) **Neuron.** 39, 889-909.
35. Nagatomo, S., Umehara, F., Hanada, K., Nobuhara, Y., Takenaga, S., Arimura, K. y Osame, M. (1999) **J. Neurol. Sci.** 162, 102-105.
36. Erikson, K.M., Syversen, T., Aschner, J.L. y Aschner M. (2005) **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 19, 415-421.
37. Gunter, T.E., Gavin, C.E., Aschner, M. y Gunter, K.K. (2006) **Neurotoxicology.** 27, 765-776.
38. Zhang, S., Fu, J. y Zhou, Z. (2004) **Toxicol. In Vitro.** 18, 71-77.
39. Erikson, K.M., Dobson, A., Dorman, D. y Aschner, M. (2004) **Sci. Total Environ.** 334, 409-416.
40. Uhl, G.R., Hedreen, J.C. y Price D.L. (1985) **Neurology.** 35, 1215-1218.
41. Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K. y Seitelberger, F. (1973) **J. Neurol. Sci.** 20, 415-455.
42. Tillerson, J.L., Caudle, W.M., Reverón, M.E. y Miller G.W. (2002) **Exp. Neurol.** 178, 80-90.

Semblanza de la Dra. María Rosa Ávila Costa



La Doctora María Rosa Avila Costa estudió la licenciatura en Psicología, maestría en Neurociencias y el Doctorado en Ciencias Biológicas en la UNAM. Fue galardonada por la UNAM, con la medalla Sor Juana Inés de la Cruz en 2007 y con el premio Estatal de Ciencia y Tecnología en el área de Ciencias de la Salud en 2011. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores Nivel II. El campo de estudio de la Doctora Ávila Costa se centra en la Neurobiología de las enfermedades Neurodegenerativas, principalmente de la enfermedad de Parkinson. Es la responsable del Laboratorio de Neuromorfología en donde ha formado alumnos de nivel licenciatura, maestría y doctorado. Ha publicado 3 artículos en revistas de circulación Nacional y 40 en revistas internacionales de alto impacto. Ha publicado un libro nacional y cuatro internacionales, es también autora de 18 capítulos en libros nacionales e internacionales. Sus publicaciones se han citado en más de 450 ocasiones. Recientemente la Dra. Avila propuso un modelo experimental novedoso para el estudio de la enfermedad de Parkinson el cual ha tenido gran impacto a nivel internacional. Ha participado en la revisión y actualización de programas académicos, ha hecho 70 dictámenes de artículos para revistas internacionales especializadas, ha evaluado varios proyectos SEP-CONACyT, y proporciona asesorías especializada a proyectos de investigación. Actualmente colabora con el grupo de Epilepsy Genetics/Genomics Laboratories and Comprehensive Epilepsy Program, UCLA School of Medicine and VA GLAHS West Los Angeles Medical Center. Actualmente es profesor Titular B en el área de Investigación y Posgrado de la FES Iztacala, UNAM.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 160 – 183, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

CICLINAS D Y CDKS EN EL INICIO DE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ

CYCLINS D AND CDKS IN THE BEGINNING OF THE CORN GERMINATION

Silvia Karina Godínez Palma y Jorge M. Vázquez Ramos

**Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, UNAM
México D.F.**

Resumen

La germinación de semillas es un buen modelo para estudiar ciclo celular dado que, a la entrada de agua, se reanuda el metabolismo que quedó detenido durante el proceso de desecación en la formación de la semilla. La germinación implica que debe de activarse la proliferación para que se produzca una nueva planta y por lo tanto, la regulación del ciclo celular es indispensable. Las ciclinas tipo D, asociadas a CDKs, son proteínas fundamentales para la percepción de un estado metabólico propicio para que haya proliferación y por lo tanto, su activación y regulación son aspectos nodales para el buen transcurso del ciclo. En maíz se han encontrado numerosos genes codificantes de ciclinas D y el estudio de la interacción de las correspondientes proteínas con diferentes CDKs y su

importancia para la germinación y el ciclo celular han constituido el propósito primario de investigación en nuestro grupo.

Palabras claves: ciclo celular, ciclinas D, CDKs, germinación, maíz

Abstract

Seed germination is a good model for cell cycle studies since metabolism, inhibited by the process of seed desiccation, is resumed soon after seeds are hydrated. Germination implies that proliferation must be activated to give rise to a new plant and thus, cell cycle regulation is vital. D-type cyclins, associated to CDKs, are fundamental proteins for the perception of the propitious metabolic status required for proliferation establishment and therefore, their activation and regulation are nodal for correct cell cycle advancement. Numerous Cyclin D genes have been found in maize and the study of the corresponding proteins, their interaction with CDKs and their importance for germination and the cell cycle have been the primary research purpose in our group.

Keywords: cell cycle, cyclins D, CDKs, germination, corn

Ciclo celular

El ciclo celular es la base para la reproducción de los organismos. Su función no es solamente originar dos nuevas células mediante la división de una célula progenitora, sino asegurar que el proceso se realice en forma regulada para la correcta formación de sistemas celulares complejos.

Antes de que pueda llevarse a cabo el proceso de división para a partir de una formar dos nuevas células, en el proceso de la mitosis la célula debe duplicar su ADN cromosómico, incrementar la cantidad de histonas y otras proteínas asociadas al ADN, multiplicar el número de organelos a repartir entre las dos células hijas y ensamblar la maquinaria proteica requerida para que se puedan separar los cromosomas durante la mitosis y la citocinesis. Estos procesos preparatorios ocurren durante la interfase, la que se divide en tres diferentes etapas metabólicas, las fases G1, S y G2.

La fase G1 es un período de intensa actividad bioquímica. La célula incrementa notablemente su actividad metabólica, sus organelos se duplican, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas; en consecuencia, la célula aumenta en tamaño. La replicación del ADN comienza cuando la célula adquiere el tamaño, la energía y todas las proteínas necesarias. El ADN es una doble hélice que durante la replicación se abre y cada cadena es utilizada como molde para la producción de una nueva doble cadena, por esta razón, la replicación del ADN se denomina semi-conservativa. Estas dos dobles cadenas de ADN quedan unidas por el centrómero hasta la mitosis, recibiendo el nombre de cromátidas hermanas. La replicación del ADN ocurre durante la fase S (síntesis) del ciclo celular, momentos después de que las histonas (H1, H2a, H2b, H3 y H4) y demás proteínas asociadas a la replicación del ADN fueron sintetizadas (ADN polimerasas, primasas, ligasas, topoisomerasas y muchas otras).

Durante la fase G2 ocurre la preparación para la mitosis; todos los organelos y la maquinaria necesaria para la división de las dos células hijas idénticas se adquieren en esta etapa. La cromatina, recién duplicada, comienza a condensarse en forma de cromosomas; además, la célula realiza una revisión completa del ADN duplicado anteriormente. Durante la mitosis, la membrana nuclear se desensambla, el citoesqueleto se reorganiza y los cromosomas se mueven a los polos opuestos. La segregación cromosómica es seguida usualmente por la división celular (citocinesis). La mitosis está dividida en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase, las cuales tienen como función promover y regular la repartición equitativa del material genético. La ruptura de la envoltura nuclear marca el inicio de la profase. Cada cromosoma está formado por dos cromátidas conectadas por el centrómero, durante la metafase los cromosomas se mueven mediante el huso mitótico y finalmente se colocan en el plano ecuatorial de la célula. En la anafase, las cromátidas hermanas se separan y son conducidas a los polos opuestos en la célula, proceso mediado por el

acortamiento del huso mitótico y la acción de múltiples proteínas. Al iniciarse la telofase, los cromosomas alcanzan los polos opuestos y el huso comienza a dispersarse en dímeros de tubulina; finalmente se re-ensambla la envoltura nuclear alrededor de los conjuntos de cromosomas y las células vuelven a salir a una fase G1.

Existen 3 puntos principales de control en la progresión del ciclo celular: 1) en la transición G1-S la célula registra que su entorno sea favorable para comenzar a duplicar el ADN; si las condiciones no son óptimas, las células en G1 pueden detener la progresión del ciclo y entrar en un estado de reposo, llamado G0, donde pueden permanecer durante días, semanas o años antes de volver a proliferar o en ocasiones prosiguen un proceso de diferenciación que elimina cualquier posibilidad futura de proliferar; 2) en la transición G2-M la célula detecta que la síntesis de ADN ha concluido correctamente y que no se han acumulado daños en el ADN sintetizado, y 3) en la transición metafase-anafase, dentro de la fase M, la célula verifica que todos los cromosomas estén unidos correctamente a los microtúbulos del huso mitótico y estén alineados en el plano de metafase. Durante la mitosis la célula se divide y, posteriormente, cada una de las células hijas comienza un nuevo ciclo (Figura 1).

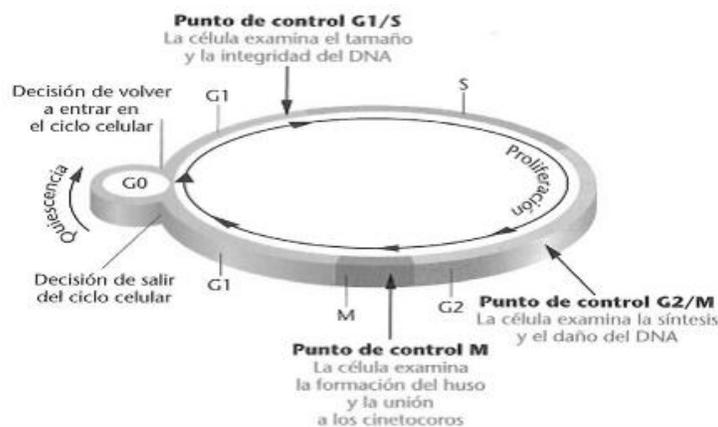


Figura 1. Representación gráfica del ciclo celular, indicando cada una de sus fases y puntos de control [1].

El ciclo celular tiene un papel determinante en el crecimiento y desarrollo de los organismos multicelulares, incluyendo las plantas [2]. En éstas, el ciclo es un proceso altamente ordenado por el que, a partir de la proliferación celular, se lleva a cabo la culminación de la germinación de una semilla para la formación de una plántula y su posterior desarrollo dirigido a la creación de todas aquellas estructuras requeridas para la generación de una nueva planta, por lo que la proliferación debe coordinarse de manera exacta y continua con la diferenciación celular.

Proteínas básicas para el ciclo celular de plantas

La maquinaria básica encargada del progreso y regulación del ciclo celular está constituida, como en otros organismos eucariotes, por cinasas dependientes de ciclina (CDKs) que, junto con diferentes ciclinas (Cyc), forman complejos CDK-Cyc encargados de fosforilar una gran variedad de sustratos en los puntos de control G1-S y G2-M [3, 4], conduciendo al inicio de la replicación del DNA y la mitosis, respectivamente. La subunidad catalítica CDK es la encargada del reconocimiento del motivo blanco de fosforilación presente en la proteína sustrato, mientras que la subunidad reguladora Cyc tiene, entre otras, la función de discriminar a distintas proteínas como sustratos [5, 6].

Los estudios sobre ciclo celular en plantas han involucrado fundamentalmente especies dicotiledóneas, principalmente *Arabidopsis thaliana*. Se conoce muy poco sobre la regulación del ciclo celular en monocotiledóneas, aunque el trabajo en arroz y maíz se ha enriquecido desde la publicación de la secuencia de sus genomas.

En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado más de 90 genes básicos que regulan la progresión del ciclo celular, los cuales pertenecen a siete familias

génicas: CDK, Cyc, CKS, CKI, E2F/DP, RB y Wee, siendo las familias de CDKs y ciclinas las que comprenden más genes [7, 8, 9, 10].

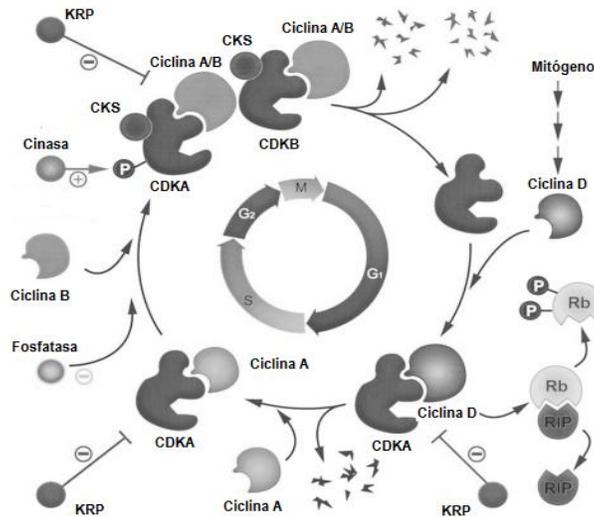


Figura 2. Formación de complejos ciclina-CDKs durante el ciclo celular de plantas, modificado de [11].

Ciclinas

Las ciclinas, como su nombre lo indica, son proteínas que fluctúan a lo largo del ciclo celular, y regulan la activación y direccionamiento de las CDKs hacia compartimentos subcelulares y sustratos específicos [5]. La actividad cinasa de las CDKs depende de la unión a las ciclinas y al igual que en los animales, las plantas tienen varios tipos de ciclinas, por lo que se forman distintos complejos involucrados en las transiciones de las diferentes fases del ciclo celular [12, 13]. Por su cercanía filogenética con genes ortólogos de otras especies, las ciclinas de *Arabidopsis* se han clasificado en los tipos A, B, C, D, H, L, T, P, SDS y J18, mientras que las CDKs se han clasificado en los tipos A, B, C, D, E, F, G y CKL (por CDK-like) [8,10]. Así mismo, en el genoma de arroz se han identificado 90

genes pertenecientes a dichas familias génicas, que podrían estar involucrados en el control de su ciclo celular [14, 15].

En *Arabidopsis*, se ha demostrado que ciclinas del tipo D como CycD2;1 y CyCD3;1 interactúan con una CDK tipo A, CDKA1, *in vivo* [16]. Además, el complejo CDKA/CYCD3 de tabaco (*Nicotiana tabacum*), purificado a partir de células de insectos, fue capaz de fosforilar *in vitro* a su proteína prototípica blanco, la proteína RBR (por Relacionada a la proteína del RetinoBlastoma) [17]. Estos resultados inicialmente mostraron la conservación que existe en los mecanismos de regulación de la transición G1/S entre los animales y las plantas, dado que la proteína RB en animales es un factor de control de la progresión del ciclo celular que es fosforilado e inhibido por complejos de ciclinas tipo D asociadas a CDKs para permitir la progresión hacia la fase S.

Las ciclinas tipo A y B son ciclinas mitóticas [18, 3]. La ciclina A de *Arabidopsis thaliana*, maíz y soya aparece en la fase S y es funcional en S y durante la transición G2/M, mientras que la ciclina B se acumula durante la fase G2 y al inicio de la fase M [19], siendo fundamental para el proceso mitótico. Estas ciclinas forman complejos activos con las cinasas CDKA y CDKB, aunque hasta ahora se tiene relativamente poca información sobre la acción molecular de los complejos entre CDKA/B y las ciclinas mitóticas.

CDKs

Las cinasas dependientes de ciclinas de plantas han sido aisladas y clasificadas en ocho grandes grupos de acuerdo a la conservación del motivo de unión a ciclinas. La CDK tipo A de plantas es homóloga a cdc2 de mamíferos, ya que conserva la secuencia aminoacídica PSTAIRE en el motivo de unión a ciclina. En este grupo de CDKs, el transcrito y los niveles de proteína no muestran una

expresión preferencial en alguna fase del ciclo celular y además son detectadas, aunque en bajos niveles, en tejidos diferenciados. Estos resultados sugieren una función dual de las CDKs tipo A en plantas, actuando tanto en la progresión a S como en el paso a M [20], por lo que estarían involucradas en la proliferación celular y en el mantenimiento de una adecuada división celular en tejidos diferenciados durante el desarrollo de la planta [21]. Como ya se mencionó anteriormente, la CDKA puede unirse a las ciclinas tipo D y fosforilar a la proteína RBR para permitir la transición de G1 a S [17].

Las CDKs tipo B poseen un motivo de unión a ciclina diferente, PPTALRE o PPTTLRE, por lo que se han dividido en dos subgrupos, CDKB1 y CDKB2; su actividad es dependiente del ciclo celular y actúan en la transición G2/M [18]. Este tipo de CDKs es único de plantas, lo que sugiere que podrían estar realizando una función regulatoria particular dentro del ciclo celular vegetal. Estudios anteriores han mostrado que las CDKs tipo B son capaces de unirse a las ciclinas tipo A ó B. No obstante, se ha encontrado interacción de ciclinas tipo D con CDKB en *Arabidopsis thaliana* [22]; particularmente se ha demostrado interacción activa entre la ciclina D4;1 y CDKB2;1, lo que parece ocurrir de manera tejido-específica ó espacio específico. Otros estudios han mostrado asociación de ciclina D3;1 y CDKB;1 de *Nicotiana tabacum*, con actividad de cinasa, en purificados de células de insectos [23].

Las otras CDKs (C, D, E y F) han sido poco caracterizadas y su función en el ciclo celular aún no es muy clara. La CDKC posee un motivo PSTAIRE de unión a ciclinas y la de *A. thaliana* se ha encontrado en células que se están dividiendo, y probablemente está involucrada en el control de la transcripción.

Las CDKs tipos D y F de plantas son homólogas funcionales de cinasas que tienen como función activar a CDKs (CAKs); tienen una secuencia NFTALRE en su dominio de unión a ciclinas y presentan similitud con CDK7 de humanos. CDKD

de arroz es capaz de fosforilar a CDKA de arroz, a CDK2 de humanos y al dominio C-terminal de la subunidad grande de la RNA polimerasa II de *A. thaliana* [24].

Finalmente, las cinasas tipo E, que poseen la secuencia SPTAIRE, presentan una señal débil constitutiva durante la sincronización del ciclo celular.

Transición G1/S y ciclinas D

La transición G1/S es uno de los principales puntos de control en el ciclo celular. Si la célula supera dicho inicio, es muy probable que se supere el punto de control de entrada a la mitosis una vez que ha completada la fase S. Este punto, como el paso por el punto de control G2, depende de una cinasa dependiente de ciclina y una ciclina.

Las ciclinas tipo D tienen una función especial en el control de la reentrada al ciclo celular al responder a señales mitogénicas y de crecimiento externas y acoplarlas a las señales de proliferación [6].

En animales, las ciclinas tipo D forman complejos con actividad de cinasa con CDK4 y CDK6, los cuales fosforilan a la proteína retinoblastoma (pRB) e inactivan su función de supresor sobre el factor de transcripción E2F, cuya acción es esencial para el compromiso de la progresión de G1 hacia S [25]. Las señales mitogénicas regulan, a niveles transcripcional y traduccional, a los complejos CDK-CycD y controlan la estabilidad de las proteínas y el ensamblaje e importe de los complejos hacia el núcleo [26]. Subsecuentemente, los complejos activos de CDK-CycD promueven la progresión de la fase G1 a S para llevar a cabo la proliferación celular.

En plantas se encuentra un patrón similar al de la vía ciclinas/pRB presente en animales [27, 28, 29]. Las ciclinas tipo D controlan la ruta en la que están involucradas la proteína RBR y los factores de transcripción E2F/DP (Figura 3). En

células arrestadas en G1, el factor E2F/DP está unido a la proteína RBR, la cual recluta desacetilasas de histonas las que, al promover la compactación de la cromatina, impiden la expresión génica. Cuando RBR es fosforilada por los complejos CycD-CDK se libera el complejo E2F/DP, que funciona como activador transcripcional permitiendo la expresión de genes requeridos para la transición de la fase G1 a S [30, 31, 32, 6].

Las ciclinas D de plantas, aunque muestran una baja similitud en su secuencia proteica cuando se comparan con las de animales; comparten este atributo clave de participar y regular la vía RB/E2F antes mencionada [29].

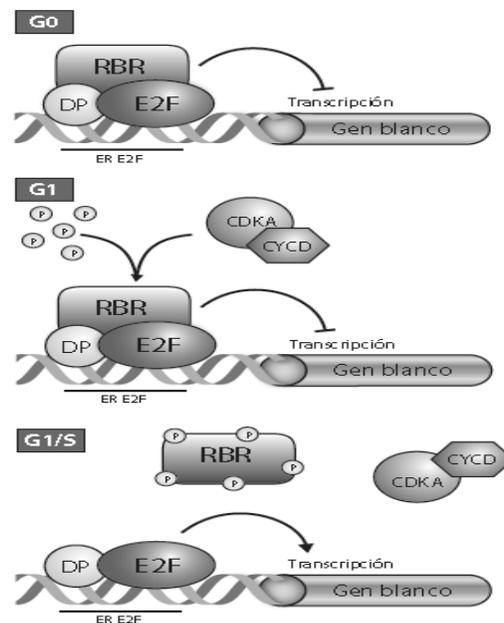


Figura 3. Modelo general de la regulación en la interfase G1-S de ciclo celular en eucariotes, modificado de [33].

La transcripción de los genes blanco de E2F está bloqueada en G0 y G1 temprana por la unión de RBR al dímero E2F-DP; cuando el complejo CYCD-CDK polifosforila a RBR, en la fase G1, se libera E2F permitiendo la expresión de genes de fase S y la progresión del ciclo celular. Las secuencias proteicas de las ciclinas

tipo D de plantas, al igual que las de otros eucariotes, muestran una misma organización estructural típica (Figura 4), con una región conservada de 250 aminoácidos que es llamada centro de ciclina, la cual consiste de dos dominios llamados amino (N) terminal y carboxilo (C) terminal [34, 8, 14, 10]. El dominio amino terminal tiene una longitud aproximada de 130 aminoácidos y dentro de esta región se encuentra una secuencia conservada de ocho aminoácidos llamada caja de ciclina, que sirve como sitio de unión a CDK. El dominio carboxilo terminal está presente en muchas pero no en todas las ciclinas, lo que sugiere que provee una función específica o adicional, pero quizá no crítica. Otra característica de las ciclinas tipo D es la presencia del motivo LxCxE, por el cual se une a la proteína RB, el cual se encuentra cercano al extremo N terminal y está presente en virtualmente todas las secuencias de ciclinas tipo D. Algunas ciclinas tipo D de plantas también poseen cajas PEST que permiten su degradación mediante el mecanismo de ubiquitinación-proteasoma.

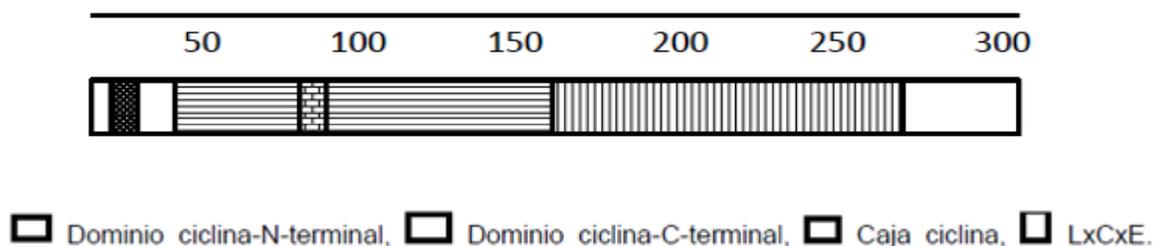


Figura 4. Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas tipo D. Escala en número de aminoácidos. Modificado de Bravo-Alberto y Buendía-Monreal, 2008.

Mientras que en el genoma humano sólo existen 3 genes que codifican ciclinas tipo D, esta familia génica se ha diversificado en plantas. Las ciclinas tipo D de plantas se han clasificado en 7 grupos (D1-D7) de acuerdo a análisis filogenéticos realizados con miembros de esta familia génica presentes en varias especies de plantas. El genoma de *Arabidopsis* contiene 10 genes y el de arroz

contiene 14 genes que codifican ciclinas tipo D, teniendo al menos un gen dentro de cada uno de los 7 grupos [8, 14].

Ciclinas D de maíz

Durante varios años nuestro grupo de investigación ha estado involucrado en estudios del ciclo celular en maíz (*Zea mays*), particularmente durante el proceso de germinación de la semilla [35, 36, 37]. Recientemente, se han dirigido los esfuerzos a caracterizar a las ciclinas D, debido a que, como reguladoras fundamentales de la fase G1 del ciclo celular, podrían tener una importancia fundamental en el establecimiento y avance de la germinación de semillas. Se conoce ya que en *Arabidopsis*, la transcripción de las ciclinas tipo D se dispara en diferentes momentos de la germinación, siendo las ciclinas CycD3;2, CycD3;3 y CycD4;1 las que son activadas más tempranamente; la protrusión de la radícula se promueve en plantas que sobreexpresan estas ciclinas y se retrasa en aquellas plantas que las tienen mutadas, lo cual no ocurre con ciclinas activadas tardíamente como CycD3;1 [38].

Se ha demostrado la presencia de diferentes ciclinas D durante la germinación de maíz y su asociación tanto con CDKs como con otras proteínas del ciclo celular. La clonación de las ciclinas D2;2, 4;2 y 5;3 permitió la obtención de péptidos que fueron utilizados para la inducción de anticuerpos específicos. Así, se pudo conocer que estas ciclinas se unen a una CDK tipo A, con la que forman complejos con actividad de cinasa y que se acumulan de manera progresiva durante la germinación. La actividad de cinasa presente en estos complejos generalmente se incrementa hasta una etapa intermedia de la germinación para decaer posteriormente hacia la germinación tardía.

El ciclo celular en plantas responde a la presencia de factores intrínsecos como son los fitorreguladores y entre éstos, el ácido abscísico, las auxinas y las citocininas son los más importantes. Mientras que el ABA actúa como un modulador negativo de la germinación [39], las citocininas estimulan la germinación de semillas [40, 35] y promueven la división celular [41]. Las auxinas participan en la integración de la división celular con la diferenciación celular, favoreciendo la elongación celular [42]. La auxina más común en plantas es el ácido indolacético (IAA). La adición de fitorreguladores, particularmente citocininas y auxinas a semillas en germinación no modificó los niveles proteicos de las diferentes ciclinas, pero si la actividad de cinasa de los complejos ciclina D-CDK, por lo que se especula que durante la germinación, los fitorreguladores promueven la formación y activación de dichos complejos [35, 37].

El genoma de maíz parece tener por lo menos 17 genes diferentes de ciclinas D, contenidos dentro de los subgrupos D1 a D7 previamente descritos para otras plantas; además, nuestro grupo ha propuesto una nomenclatura basada en los porcentajes de identidad de las ciclinas D de maíz con respecto a los respectivos ortólogos presentes en arroz y Arabidopsis. También, mediante análisis *in silico* se confirmó en los genes de maíz la presencia de los dominios-ciclina característicos de los genes de ciclinas D y la organización genómica de los diferentes genes mostró que son similares a sus ortólogos en arroz y Arabidopsis.

Se ha observado la expresión de al menos 15 de los 17 genes de ciclinas D durante la germinación de maíz, la mayoría de forma tal que el transcrito se acumula progresivamente según la germinación avanza. Adicionalmente, estos 15 genes se expresan también en diferentes tejidos de plántulas (mesocotilo, puntas de raíz y primera hoja), aunque dicha expresión ocurre de manera diferencial, esto es, las 15 ciclinas se expresan en por lo menos uno de los tejidos de la plántula; los mayores niveles se han encontrado en tejido de raíz [43].

La adición de fitohormonas mitogénicas como auxinas o citocininas no parece modificar importantemente los niveles de transcrito de las diferentes ciclinas D durante la germinación; por otro lado, la adición de ácido abscísico si repercute en una disminución de la expresión de varios de estos genes a lo largo de la germinación. De acuerdo a lo expresado arriba sobre el efecto de los fitoreguladores a nivel de actividad enzimática, pareciera que éstos pueden regular al ciclo celular de manera particular y en niveles diferenciales.

El papel de cada una de las ciclinas D durante la germinación y el crecimiento de las plantas, así como su interacción con otras proteínas del ciclo celular es un tema muy relevante, del cual se conoce poco. Aunque las ciclinas tipo D se encuentran clasificadas dentro del grupo de ciclinas llamadas originalmente como proteínas de G1, se ha mostrado que algunas de las ciclinas D de plantas muestran una expresión constitutiva en todo el ciclo celular [22] y aunque la asociación con CDKA es la más frecuentemente reportada, son cada vez más los reportes de asociación con CDKB, lo que sugiere un posible papel de las ciclinas D en la transición G2/M [7,10].

La regulación de los complejos de ciclinas con cinasas se establece a diferentes niveles. La asociación de una ciclina con una CDK determina la estabilidad, localización y especificidad por un sustrato; la actividad de los complejos ciclina-CDK también puede variar. El estado de fosforilación tanto de la CDK como de las ciclinas es fundamental tanto para la actividad del complejo [44], como para la estabilidad, particularmente de las ciclinas [45]. Otro nivel de regulación esta dado por su asociación con proteínas que tienen función dual, sea de estabilizadores de complejos o bien de inhibidores de la actividad de cinasas, o de la asociación de CDKs y ciclinas [46,47]. Este es un campo muy poco explorado en el caso de plantas y ha sido uno de los ejes de trabajo de nuestro

grupo en los últimos años. Nuevamente, se ha utilizado la germinación de maíz como modelo, ya que la inducción del ciclo celular es un factor imprescindible para que una semilla de origen a una nueva planta.

Regulación de los complejos ciclinas D-CDKs durante la germinación de maíz

Dada la existencia de múltiples ciclinas y CDKs en plantas, y particularmente en maíz, el estudio de la presencia y asociación de ciclinas tipo D con CDKs necesariamente parte de poder identificar a cada una de manera específica. Desafortunadamente, mientras que para células animales o para levaduras se pueden adquirir comercialmente toda una batería de anticuerpos contra las principales proteínas de ciclo celular, no es el caso para plantas y se deben de desarrollar las herramientas experimentales desde cero. La producción de anticuerpos específicos tanto para las ciclinas tipo D, como para las CDKs de maíz ha sido determinante para el estudio de la presencia y asociación de estas proteínas durante la germinación. El estudio de aspectos regulatorios de su función también se facilita: estabilidad, actividad de cinasa asociada, determinación de las múltiples combinaciones posibles ciclina-cinasa a lo largo de la germinación, estado de fosforilación de las CDKs con respecto al avance del ciclo celular y otras. Se describen a continuación algunos de los avances logrados.

Estabilidad de ciclinas D

La mayoría de las ciclinas D poseen secuencias PEST, lo que indica que tienen un mecanismo de degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma. La ruta de degradación en plantas es aún materia de estudio, sin embargo, algunas de las ciclinas D de plantas poseen secuencias PEST y existe evidencia de recambio vía el proteasoma.

En maíz se ha estudiado la estabilidad de tres ciclinas D, D2;2, D4;2 y D5;3. El seguimiento de estas proteínas durante la germinación ha mostrado que las tres están presentes en semilla seca, a niveles semejantes y sus niveles se mantienen relativamente constantes hasta las 12-18h después de lo cual la cantidad disminuye; sin embargo, los ensayos de vida media utilizando inhibidores de síntesis de proteínas demostraron que poco después de iniciada la germinación (3-6 h), las tres ciclinas virtualmente desaparecen, sugiriendo que debe de haber un eficiente proceso de síntesis-degradación que probablemente participe en la regulación de la relación ciclo celular/ germinación.

Asociación de las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 con CDKA y CDKB1;1

Las ciclinas promueven cambios conformacionales en el sitio catalítico de las CDKs que permite su activación; son además las responsables de seleccionar el sustrato blanco, la localización subcelular y la estabilidad de los complejos ciclina-CDK [8]. De este modo, el avance del ciclo celular en eucariontes está controlado en gran medida por las posibles formas de asociación entre las ciclinas y las CDKs [10].

En maíz, el estudio de la asociación de las ciclinas D con CDKA ó CDKB1;1 sugiere una posible actividad diferencial de los complejos a lo largo de la germinación; los complejos de ciclinas D2;2 y D4;2 con CDKA, en apariencia, se establecerían en tiempos tempranos de la germinación, implicando así que funcionarían en las fases G1 y S del ciclo celular, mientras que el complejo de ciclina D5;3 con CDKA podría ser importante hacia el final de la germinación, quizás en G2.

Ensayos por doble híbrido han determinado que solo algunas ciclinas tipo D de plantas interactúan con CDKB [49]; sin embargo, en maíz las tres ciclinas tipo D estudiadas mantienen una interacción diferencial con CDKB1;1, sugiriendo que las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 podrían no solo estar participando en el control

de la transición G1/S cuando se encuentran asociadas a CDKA, sino probablemente también puedan estar participando en los procesos de control de G2/M durante el proceso germinativo. Una función específica de tejido también es posible, dada la expresión diferencial de sus mensajeros en tejidos como hoja, raíz y meristemas de maíz [43]. Ejemplos de lo anterior se han reportado para el caso de ciclinas tipo D (D4;1-CDKB2;1) en *Arabidopsis thaliana* [48].

Actividad diferencial de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKs durante la germinación en maíz.

Los sustratos de los complejos ciclina-CDK incluyen reguladores de citoesqueleto, proteínas de matriz y membrana nuclear, proteínas asociadas a cromatina, reguladores transcripcionales, así como otras proteínas del ciclo celular [49, 50, 51]. La actividad de cinasa de los complejos ciclinas D-CDKs, determinada como su capacidad de fosforilar a la proteína RBR de maíz, parece ser diferencial para cada complejo. Cada par ciclina-cinasa parece presentar tiempos específicos de actividad durante la germinación, lo que quizás implique la fosforilación de diferentes sustratos en diferentes etapas del ciclo.

Mediante el uso de inmunoprecipitaciones secuenciales, se pudo determinar que las ciclinas D2;2 y D4;2, asociadas a CDKA, se encuentran activas en las primeras horas de la germinación, mientras que el complejo con la ciclina D5;3 se encuentra activo durante todo el proceso germinativo, sugiriendo que la función de este complejo es importante para el control de los eventos moleculares que marcan las transiciones G1-S y G2-M del ciclo celular. Por otro lado, la asociación que muestran las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 con CDKB1;1 se manifiesta también en la presencia de actividad de cinasa, lo que implica que su unión no es un artificio experimental. La fosforilación de la proteína RBR de maíz, mediada por el complejo ciclina D2;2-CDKB1;1, se mantiene constante durante la germinación, mientras que diferencias significativas se observan para la actividad en los complejos ciclina D4;2-CDKB1;1 y ciclina D5;3-CDKB1;1, ya que en ambos

casos la actividad solo se manifiesta en tiempos específicos de la germinación, siendo más evidente para el complejo con D5;3, en el cual no hay actividad de cinasa sino hasta los tiempos finales de la germinación, cuando el ciclo celular se encuentra en la transición G2/M.

Lo anterior sería un argumento a favor de un modelo en el que las múltiples ciclinas D de maíz, en conjunción con las correspondientes CDKs, realizan funciones complementarias, no redundantes.

Estados de fosforilación de las CDKs unidas a las ciclinas D

La funcionalidad de una CDK puede ser modulada reversiblemente por la fosforilación de algunos residuos de aminoácidos específicos, particularmente una treonina muy conservada que se encuentra alrededor de la posición 160 [4], siendo así que el complejo ciclina-CDK se vuelve activo como cinasa; la proteína responsable de las fosforilaciones activadoras se denomina CAK (CDK activating kinase). En plantas la ciclina tipo H, en conjunción con la CDKF;1 desempeña una función como CAK [52], y parece actuar prioritariamente en G1/S [53], mientras que la regulación de la actividad del complejo CAK en G2/M no ha sido plenamente establecida [6,42].

Las CDKs son también reguladas negativamente por fosforilación, en este caso en residuos alrededor del sitio de unión a ATP (residuos T14 y Y15), por la acción de las proteínas cinasas Wee1 y Myt1 [54,55], inhibición que es revertida por la fosfatasa Cdc25. Similares fosforilaciones inhibitorias se producen en las CDKs de plantas y se ha reportado la existencia de proteínas tipo Wee1, sin embargo no ha sido posible encontrar un homólogo estructural de Cdc25. Interesantemente, la expresión de Cdc25 de levadura en células vegetales promueve el crecimiento y la proliferación celular [56, 57, 58]. La actividad de cinasa en los complejos ciclina D-CDK de maíz podría igualmente regularse por su estado de fosforilación. Sitios equivalentes a T160, T14 y Y15 se encuentran en

las CDKs (tipos A o B) de maíz. En inmunoprecipitados con anticuerpos anti-ciclinas D, la fosforilación activante (T160) de las CDKs asociadas a las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3, se encuentra más marcada durante las primeras horas de germinación; para los complejos de ciclinas D2;2 ó D5;3 con CDKs, la fosforilación disminuye hacia el final de la germinación, mientras que en el caso del complejo de la ciclina D4;2 con CDKs, este tipo de fosforilación desaparece después de las 12h de germinación. De nuevo, los datos sugieren que habría tiempos específicos de activación de los diferentes complejos ciclinas D-CDKs.

La CDK en los complejos con ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 estaría también siendo regulada negativamente por fosforilaciones en T14 y Y15. Durante la germinación, la fosforilación aumenta entre las 12 y las 18 horas para los complejos de ciclinas D4;2 y D5;3 con CDKs e, interesantemente, en ambos casos la actividad de cinasa asociada a complejos de ciclinas con CDKB1;1 desaparece (ver arriba), mientras que el aumento de la fosforilación de estos residuos en los complejos ciclina D2;2-CDKs coincide con la disminución en la actividad de cinasa total a las 18 h.

Estos resultados sugieren que las CDKs asociadas a las ciclinas D estudiadas, podrían estar regulando la transición G2/M mediante la fosforilación en T14 y Y15, ya que al parecer la cinasa más afectada por este tipo de fosforilaciones es la CDKB1;1; aunque no se descarta que las plantas hayan desarrollado una vía alterna para controlar el proceso de mitosis [59].

Los experimentos para conocer el estado de fosforilación de cada CDK, sea A o B, durante la germinación, indicaron de manera sorprendente que mientras que la CDKA puede estar fosforilada ya sea en la T160 (más abundante al inicio que al término de la germinación), o en los residuos T14 y Y15 (más abundante al término de la germinación), la CDKB1;1 solo se fosforila en los residuos inhibitorios, T14 y Y15, pero no parece estar fosforilada (o muy pobremente) en

T160. No obstante, en otros tejidos como raíz y hoja, la fosforilación activante si esta presente en CDKB1;1. Pudiera ser que buena parte de la actividad de cinasa durante las primeras horas de la germinación, cuando las células se encuentran en G1 y su transición hacia S, se debiera a complejos de ciclinas con CDKA y en fases posteriores hubiera una combinación de ambas CDKs unidas a las diferentes ciclinas. Se requiere más trabajo bioquímico para determinar el grado de actividad que tendrían las CDKs, cuando en forma individual se unen a cualquiera de las ciclinas, cuando están fosforiladas en residuos activantes o inhibitorios, para así poder determinar su participación en los ciclos celulares que ocurren durante la germinación de semillas.

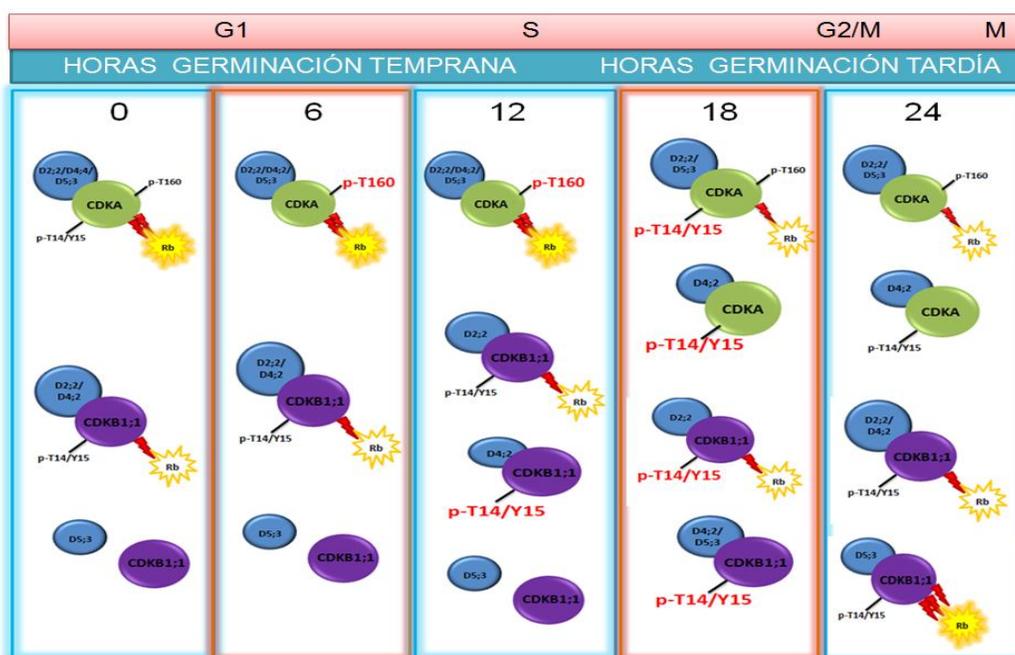


Figura 5. Representación esquemática de la regulación de los complejos ciclinas D-CDKs durante la germinación en ejes embrionarios de maíz.

Conclusión

El avance y culminación de la germinación dependerá de una proliferación exitosa de las células del eje embrionario para culminar con el establecimiento de

una plántula; será primordial que al inicio de la germinación se enciendan todos los mecanismos que permiten el establecimiento del ciclo celular. Las ciclinas D son parte nodal del mecanismo de percepción celular de un estado propicio para la proliferación. Por esto, su asociación para formar los complejos ciclinas D-CDKs, dependerá de múltiples factores: 1) la cantidad y tipo de ciclinas D disponibles, dada la evidencia de que la multiplicidad de ciclinas D no necesariamente lleva a redundancia en función; 2) su asociación con una ó más CDKs, quizás en tiempos específicos de las diferentes fases de la germinación o del ciclo celular (o de ambos) y 3) la actividad de cinasa que dichos complejos puedan desarrollar, ya sea por el estado de fosforilación de cada CDK, o bien por su asociación con factores proteicos inhibitorios. La hipótesis de que cada ciclina D, asociada a una CDK, pudiera elegir sus sustratos específicos de fosforilación, deberá ser probada, una vez que se pueda aislar cada complejo de manera inequívoca.

Referencias

1. Klug, W.S. and Cummings, M.R. (1999) Conceptos de genética. Prentice Hall.
2. Dewitte W, Murray JAH (2003). *Annu. Rev. Plant. Biol.* **54**: 235– 264.
3. Pines, J (1995) *Biochem. J.* **308**: 697–711.
4. Huntley R.P. y Murray J.A.H. (1999) *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2**: 440–446.
5. Jackman. M, Lindon. C, Nigg, E.A. y Pines, J. (2003) *Nat. Cell. Biol.* **5**: 143–148.
6. Inzé, D. y De Veylder, L. (2006) *Annu. Rev. Genet.* **40**: 77-105.
7. Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., Inzé, D. (2002) *Plant Cell* **14**: 903–916.
8. Wang, G.F., Kong, H.Z., Sun, Y.J., Zhang, X.H., Zhang, W., Altman, N., Depamphilis, C.W. y Ma, H. (2004) *Plant Physiol* **135**: 1084–1099.
9. Torres-Acosta, J.A., de Almeida, Engler, J., Raes, J., Magyar, Z., De Groot, R., Inzé, D. y De Veylder, L. (2004) *Cell Mol. Life Sci.* **61**: 1485-1497.
10. Menges, M., de Jager, S.M., Gruijsem, W., Murray, J.A. (2005) *Plant J.* **41**: 546-566.
11. Mironov, V., De Veylder, L., Montagu, M., Inzé D (1999). *Plant Cell* **11**: 509–521.
12. Stals, H. and Inzé, D. (2001). *Plant Science* **6**: 359-364.

13. Oakenfull, E.A., Riou Khamlichi, C., Murray, J. (2002). *Biol Science* **357**: 749-760.
14. La, H.G., Li, J., Ji, Z.D., Cheng, Y.J., Li, X.L., Jiang, S.Y., Venkatesh, P.N., Ramachandran, S. (2006). *Mol Genet Genomics* **275**: 374-386.
15. Guo, J., Song, J., Wang, F., Zhang, X.S. (2007) *Plant Mol Biol* **64**: 349-360.
16. Boniotti, M.B., Gutiérrez, C. (2001) *Plant J* **28**:341-350.
17. Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H., Shinmyo, A. (1999). *Plant J* **18**: 243-252.
18. Mironov, V., De Veylder, L., Montagu, M., Inzé, D. (1999). *Plant Cell* **11**: 509–521.
19. Renauding, J. P., Colasanti, J., Rime, H., Yyuan, Z. and Sundaresan, V. (1994). *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, **91**, 7375.
20. Ferreira, P. C. G., Hemerly, A. S., Villaroel, R., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1991). *Plan Cell* **3**, 531.
21. Martinez, M.C., Jørgensen, J.E., Lawton, M.A., Lamb, C.J., Doerner, P.W. (1992). *Proc Natl Acad Sci* **16**:7360-7364.
22. Kono, A., Umeda-Hara, C., Lee, J., Ito, M., Ichimiya, H., Umeda, M. (2003) *Plant Physiol* **132**: 1315-1321.
23. Kawamura, K., Murray, J.A.H., Shinmyo, A., Sekine, M. (2006) *Plant Mol Biol* **61**: 311-327. Shimotohno, A., Matsubayashi, S., Yamaguchi, M., Uchimiya, H. and Umeda, M. (2003) *FEBS Lett.* **534**: 69–74.
24. Harbour, J.W., Dean, D.C. (2000) *Genes Dev* **14**: 2393–2409.
25. Sherr, C.J., Roberts, J.M. (2004) *Genes Dev* **18**: 2699–2711.
26. Grafi, G., Burnett, R.J., Helentjaris, T., Larkins, B.A., De Caprio, J.A., Sellers, W.R., Kaelin, W.G. Jr. (1996) *Proc Nat Acad Sci USA* **93**: 8962-8967.
27. Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J., Gutiérrez, C. (1996) *EMBO J* **15**: 4900- 4908.
28. Ramírez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B., Gutiérrez, C. (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 3527-3533.
29. Dyson, N. (1998) *Genes Dev* **12**: 2245- 2262.
30. Sekine, M., Ito, M., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H., Shinmyo, A. (1999) *FEBS Lett* **460**: 117-122.
31. Uemukai, K., Iwakawa, H., Kosugi, S., De Jager, S., Kato, K., Kondorosi, E., Murray, J.A.H., Ito, M., Shinmyo, A., Sekine, M. (2005) *Plant Mol Biol* **57**: 83-100.
32. Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A.H. (2002) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 749–760.
33. Nugent, J.H., Alfa, C.E., Young, T., Hyams, J.S. (1991) *J Cell Sci* **99**: 669-674.
34. Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F., Vázquez-Ramos, J.M. (2005) *Plant Cell Physiol* **46**:166-73.
35. Quiroz-Figueroa, F. y Vázquez-Ramos, J.M. (2006) *Physiol Plant* **128**: 556-568.

36. Lara-Núñez, A., De Jesús, N., Vázquez Ramos, J.M. (2008) *Physiol Plant* **132**: 79–88.
37. Masubelele, N.H., Dewitte, W., Menges, M., Maughan, S., Collins, C., Huntley, R., Nieuwland, J., Scofield, S., Murray, J.A.H. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 15694-15699.
38. Quatrano, R.S. (1987). Ed. PJ Davies, Nijhoff, Dordrecht, Hol., p. 494.
39. Van Staden, J. (1983). *Physiol Plant* **58**: 340-346.
40. Miller, C.O., Skoog, F., Okamura, F.S., Von Saltza, M.H., Strong, F.M. (1956). *J Am Chem Soc* **78**: 1375-1380.
41. De Veylder, L., Beeckman, T., Inzé, D. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 655-665.
42. Buendía, M.M., Rentería, C.I., Guerrero, A.O., Bravo, A.C., Martínez, C.L., García, E. and Vázquez, R.J. (2011) *Physiologia Plantarum* **143**: 297–308.
43. Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqmar, A., Murray, J.A.H. (1999) *Science* **283**: 1541–1544.
44. Fyvie, M.J., Murray, J.A.H., Kilby, N.J. (2002) *Genesis* **28**: 68–74.
45. Verkest, A., Weint, C., Inzé, D., De Veylder, L., Schnittger, A. (2005) *Plant Physiol* **139**: 1099–1106.
46. Verkest, A., Lara de O Manes, C., Vercruyse, S., Maes, S., Van Der Schueren, E., et al (2005) *Plant Cell* **17**: 1723–1736.
47. Swaminathan, K., Yang, Y., Grotz, N., Campisi, L., Jack, T. (2000) *Plant Physiol* **124**: 1658–1667.
48. Norbury, C., Nurse, P. 1992. *Annual Review of Biochemistry* **61**: 441–470.
49. Koch, Ch., Nasmyth, K. 1994. *Current Opinion in Cell Biology* **6**: 451–459.
50. Joubert, J., Chevalier, C., Dudits, D., et al. 2000. *Plant Molecular Biology* **43**: 607–620.
51. Shimotohno, A., Umeda-Hara, C., Bisova, K., Uchimiya, H., Umeda, M. 2004. *The Plant Cell* **16**: 2954–2966.
52. Yamaguchi, M., Fabian, T., Sauter, M., et al. 2000. *The Plant Journal* **24**: 11–20.
53. Dunphy, W.G. (1994) *Trends Cell Biol* **4**: 202–207.
54. Fowler, M.R., Eyre, S., Scott, N.W., Slater, A., Elliott, M.C. (1998) *Mol Biotechnol* **10**: 123-53.
55. Bell, M.H., Halford, N.G., Ormrod, J.C., Francis, D. (1993) *Plant Mol Biol* **23**: 445–451.
56. McKibbin, R.S., Halford, N.G., Francis, D. (1998) *Plant Mol Biol* **36**: 601–612.
57. Lipavská, H., Masková, P., Vojvodová, P. (2011) *Annals Bot* **107**: 1071-1086.
58. Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.P., et al. 2001. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 36354–36360.

Semblanza del Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos



Químico Farmacéutico Biólogo por la Facultad de Química de la UNAM, realizó estudios de doctorado en la Universidad de Oxford, Inglaterra, en donde obtuvo el grado de Doctor en 1981. Actualmente es Profesor Titular C de Tiempo Completo de la misma Facultad y ha dirigido cerca de 70 tesis de licenciatura, maestría y doctorado.

Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel III. Tiene cerca de 80 artículos publicados, considerando artículos originales, capítulos en libros, memorias en extenso y artículos de difusión. Ha sido revisor de artículos para más de 10 revistas internacionales de gran reconocimiento en el campo. Actualmente se desempeña como Director de la Facultad de Química de la UNAM



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 184 – 195, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

Participación de O-glicanos tipo mucínico y galectina-3 en la metástasis cerebral de origen mamario

Participation of mucin-type O-glycans and galectin-3 in brain metastases of breast origin

Miguel Mayoral^{1,2}, Edgar Zenteno³, Blanca Espinosa⁴, Jorge Guevara³

¹ Centro de Investigación en Ciencias Médicas y Biológicas, Facultad de Medicina y Cirugía, UABJO. ² Centro Multidisciplinario en Ciencias UABJO-UNAM

³ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

⁴ Departamento de Bioquímica, INER.

*mianmayo@yahoo.com

Resumen

La metástasis es la más grave complicación del cáncer y la principal causa de muerte por esta enfermedad. Diversos mecanismos han sido descritos durante la progresión tumoral y la metástasis. Sin embargo, poco se ha explorado en el campo de la glicobiología y la metástasis al cerebro. Las modificaciones en la glicosilación de glicoconjugados ha sido asociada con eventos de transformación celular, migración y metástasis. Una de las modificaciones presentes en la carcinomatosis es la presencia de estructuras glicosídicas truncadas como los antígenos O-glicosídicos tipo mucínicos. Una posibilidad de interacción como ligando-receptor de las estructuras O-glicosídicas es la presencia de moléculas de adhesión que reconocen lactosaminas como galectina-3 que ha sido implicada en la progresión tumoral. Siguiendo esta vertiente, exploramos la presencia de estructuras O-glicosídicas tipo mucínico en las metástasis a cerebro de origen mamario, y comparamos con tumores mamaros primarios y tejido mamario sano, en busca de la participación de galectina-3 como ligando de estas estructuras. La

interacción de estas moléculas podría favorecer la proliferación tumoral y la metástasis exitosa al cerebro.

Palabras clave: O-glicanos, galectina-3, glicosilación, metástasis

Abstract

Metastasis is the most serious complication of cancer and the leading cause of death from this disease. Several mechanisms have been described during tumor progression and metastasis. However, little has been explored in the field of glycobiology and brain metastases. Changes in glycosylation of glycoconjugates have been associated with cellular transformation events, cell migration and metastasis. One of the main modifications present in carcinomatosis is O-glycosidic antigens of the mucin type in a truncal structure. One possibility of such ligand-receptor interaction of O-glycosidic structures is the presence of adhesion molecules that recognize lactosamines as galectin-3 that has been implicated in tumor progression. Following this aspect, we explored the presence of O-glycosidic structures of the mucin type in brain metastases of breast origin, and compared with primary breast tumors and healthy breast tissues, seeking the participation of galectin-3 as a ligand of these structures. The interaction of these molecules may promote tumor growth and favor successful metastasis to the brain.

Keywords: O-glycans, galectin-3, glycosylation, metastasis

Introducción

La metástasis es la causa más común de lesiones tumorales intracraneales y la principal y más grave complicación en el cáncer. Más del 45% de los pacientes con cáncer desarrollan eventualmente metástasis durante el curso de la enfermedad. En la actualidad el tratamiento contra masas cancerosas primarias como cirugía, radioterapia o quimioterapia, ha hecho que sean más efectivas las medidas contra el cáncer, y los pacientes obtienen una supervivencia mayor que en décadas pasadas. Sin embargo, las metástasis al cerebro continúan apareciendo en pacientes meses o años después de la terapia contra el cáncer primario original. Las metástasis al cerebro tienen un pobre pronóstico a pesar de las modernas técnicas de tratamiento.

Entender los mecanismos que emplean las células tumorales para migrar a la distancia y establecer siembras tumorales, podría ofrecer estrategias de

prevención de la metástasis tumoral, o modificar el curso de la enfermedad si se detecta a tiempo. Se han propuesto diversos mecanismos mediante los cuales las células pueden migrar a distancia y establecer las metástasis. Uno de estos mecanismos tiene lugar a través de la interacción de carbohidratos presentes en glicoconjugados.

Las funciones que desempeñan los glicoconjugados asociados a tumores en diversas interacciones celulares son variadas, y muchas de ellas aún no descritas. Se ha sugerido que los glicoconjugados podrían ser clave para la transformación maligna, facilitando la migración tumoral y metástasis al alterar las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular [1,2]. En este sentido, los glicoconjugados desempeñan funciones importantes en el desarrollo, la diferenciación celular, y en condiciones patológicas [1-3]. El papel de los O-glicanos en la adhesión celular tumoral y metástasis se ha evidenciado en células con alto potencial metastásico de modelos murinos en los que la presencia de estructuras O-glicosídicas median la adhesión celular heterotípica [4].

La O-glicosilación tipo mucínica, la más común de los tipos de O-glicosilaciones, es generada por la familia de enzimas UDP-GalNAc:polipéptido GalNAc transferasa, que adiciona residuos de GalNAc a residuos selectos de Ser o Thr. Posteriores modificaciones de rutas glicosídicas de ensamblaje de la cadena O-glicosídica involucra diferentes rutas biosintéticas de adición y remoción de residuos de carbohidratos. Los O-glicanos presentes en glicoproteínas inician como un centro de iniciación-1 (*core-1*) ($\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc-Ser/Thr}$, o también llamado antígeno T), por la actividad de la enzima UDP-GalNAc: $\beta 1,3\text{Gal}$ -transferasa que puede convertir a *core-2* complejo por la enzima UDP-GlcNAc: $\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc}\alpha 1,6\text{GlcNAc}$ transferasa. Mediante posteriores modificaciones puede formarse el centro tipo mucínico *core-3* por la enzima UDP-GlcNAc: $\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{GlcNAc}$ -transferasa [5] o estructuras glicosídicas más complejas como el *core-8* catalizado por la *core-8- $\alpha 3\text{Gal}$* -transferasa [6]. Uno de

los O-glicanos tipo mucínicos más ampliamente propuesto asociado al cáncer es el disacárido antigénico *Thomsen-Friedenreich*, también llamado antígeno-*T* [3]. El antígeno *T* es un disacárido *core-1* tipo mucínico Gal β 1,3GalNAc y es el centro de iniciación disacárido para O-glicoconjugados que se expresan en la superficie celular de muchos carcinomas humanos [3,7], motivo por el que se considera un antígeno pancarcinomatoso. En células sanas, los O-glicanos asociados al antígeno *T* se encuentran crípticos [8] y se ha sugerido que en células tumorales de mama participan en la agregación homotípica y la adhesión heterotípica al endotelio [9].

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que reconocen residuos de carbohidratos o precipitan glicoconjugados. Han sido empleadas como herramientas importantes para la caracterización de oligosacáridos y el aislamiento de poblaciones celulares [10]. La lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) tiene especificidad por el disacárido antígeno-*T* en O-glicopéptidos que pueden estar en forma sialilada. La lectina *Arachis hypogaea* (PNA) tiene especificidad por residuos de Gal en posiciones terminales de glicoconjugados no sialilados y también muestra afinidad por residuos GalNAc o lactosaminas. La lectina *Machaerocereus eruca* (MEA) interactúa con O-glicanos bi-antenarios que poseen estructuras terminales Fuc α 1,2(GalNAc α 1,3)Gal β 1,4 en estructuras mucínicas complejas.

En 1994 Barondes *et al.* propusieron nombrar a una familia de lectinas de origen animal que reconocían específicamente Gal o Lactosaminas, como galectinas. Las galectinas son una familia de lectinas solubles que reconocen β -galactósidos y modulan la adhesión célula-célula y las interacciones célula-matriz extracelular [11], desempeñando un papel clave en la progresión tumoral [12]. Galectina-3 contiene un solo dominio de reconocimiento a carbohidratos que liga a glicoconjugados que contienen Gal [13,14]. Galectina-3 se expresa en epitelios del colon, macrófagos inflamatorios, carcinomas papilares y foliculares, astrocitos

neoplásicos, y algunos linfocitos T y B. La sobre-regulación de galectina-3 está implicada en la progresión tumoral y la metástasis. Galectina-3 ha sido empleada como marcador para el diagnóstico en casos que implican adenomas y carcinoma de células Hürthle. Recientemente, se ha sugerido que galectina-3 desempeña un papel crucial en la metástasis [12] al promover la adhesión celular [11], la invasión [15], así como al ser antagonista de la apoptosis celular tumoral [16].

Lo más interesante de galectina-3, es su amplia participación en diversas vías celulares y a distintos niveles (figura 1), teniendo propiedades anti-apoptóticas interfiriendo receptores inductores de apoptosis de la familia del factor de necrosis tumoral (TRAIL, Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), que de forma normal induce la muerte celular acoplado receptores glicosídicos específicos de muerte celular [17]. Galectina-3 al estar soluble, es un promotor de la metástasis al modificar la localización de mucina MUC1 en la superficie celular tumoral [18], e interacciona con proto-oncogenes como Pim-1 que controlan la actividad tirosin-cinasa y compite con p53, activando la proliferación celular, suprimiendo la apoptosis y la diferenciación y estabilidad génica [19], y con oncogenes K-Ras que contribuyen al fenotipo maligno [20] promoviendo su activación crónica y bloqueando la diferenciación celular [21] eventos necesarios para el potencial agresivo tumoral. Más aún, parece existir una coordinada expresión de galectina-3 y sus ligandos en la matriz extracelular para promover la migración celular y generar y favorecer la metástasis [22]. Adicionalmente a los mecanismos descritos para la promoción de la migración celular tumoral, ejercidos por galectina-3, ésta es capaz de vincularse con *N*-glicanos presentes en alfa-3, Beta-1 integrinas y ejercer la formación de lamelipodios en la membrana celular iniciadores de la motilidad celular [23]. Por otro lado, galectina-3 sobre-regula la presencia de receptores activados por proteasa-1 (PAR-1, Protease-activated receptor-1) y metaloproteinasas de matriz-1 (MMP-1, Matrix metalloproteinase-1) facilitando la motilidad celular [24] e incluso incrementándola [25]. En células de leucemia mielógena crónica, galectina-3

promueve la resistencia celular a fármacos antineoplásicos, y esta expresión parece ser inducida por el microambiente tumoral [26]. A nivel de la interacción con la vasculatura, la presencia de galectina-3 induce de la respuesta angiogénica, siendo clave en la neovascularización y redistribución del riego sanguíneo, así como acceso al torrente circulatorio [27]. La presencia de galectina-3 regula la función de células T al estar anclada a la superficie celular y formar láctices que interfieren con receptores [28], siendo considerada un modulador de la progresión tumoral [29].

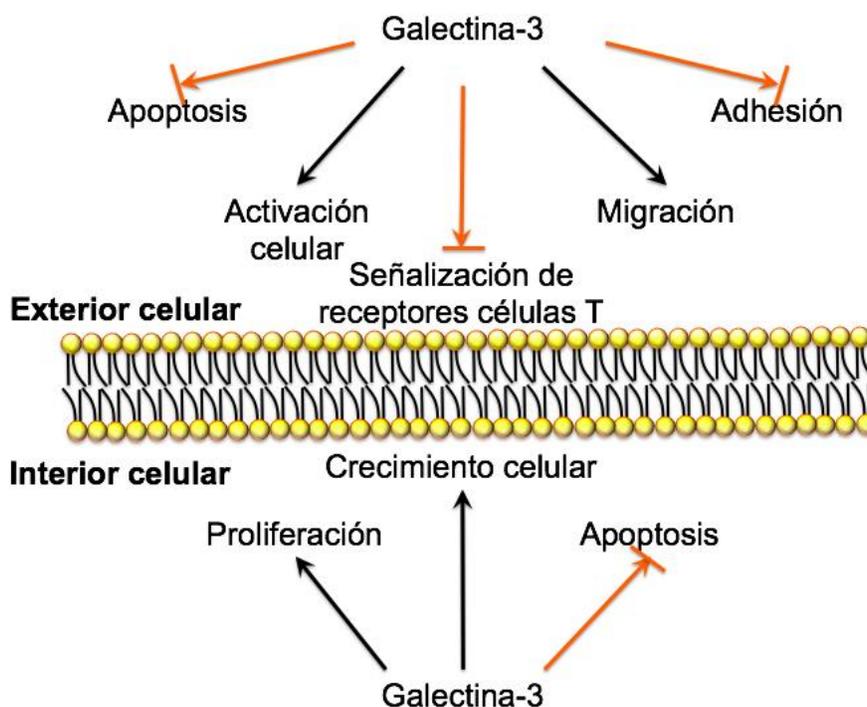


Figura 1. Algunas de las acciones de galectina-3 a nivel extra- e intracelular.

Debido a su participación en la carcinomatosis, la presencia de galectina-3 en masas tumorales es una herramienta de valor pronóstico [30-32], cáncer de vejiga [33]. La presencia de galectina-3 ha servido incluso como herramienta de discriminación entre poblaciones celulares de origen tumoral cerebral [34] y predictor de sobrevida [35].

Aunque se ha descrito la participación de galectina-3 y sus ligandos en la promoción de la proliferación tumoral y el potencial metastásico, poco se ha abordado respecto a la participación de este binomio en las metástasis al cerebro. En este sentido, nuestro equipo analizó la presencia de galectina-3 y las diferencias específicas en los patrones de O-glicosilación que pueden estar presentes en la metástasis de origen mamario. Empleando lectinas que muestran especificidad a diferentes O-glicanos, y localizando la presencia de galectina-3 con anticuerpos, analizamos la participación de ambas expresiones en la progresión tumoral y su capacidad metastásica al cerebro. Encontramos un patrón diferencial de expresión de galectina-3 en tejidos sanos, tumorales de adenocarcinoma mamario primario y adenocarcinoma mamario metastásico en cerebro [36]. Además, describimos una co-expresión de las zonas de galectina-3 con O-glicanos tanto simples como complejos, en los tumores primarios y metastásicos, coincidentes en todos ellos. Nuestros resultados sugieren que al igual que se ha reportado la co-expresión, en ocasiones inducida, de mucinas y galectina-3, en las metástasis a cerebro de origen mamario podría reproducirse este patrón de co-expresión de mucinas ricas en estructuras O-glicosídicas tanto simples de tipo antígenos T o Tn, como complejas.

Es probable que esta co-expresión favorezca la proliferación tumoral a distancia, dando mayor importancia a esta forma glicosídica sobre otras estructuras que típicamente han sido reportadas como tumorales, tales como la hipersialilación y la hiperfucosilación [37]. Nuestras investigaciones futuras serán en torno a la maquinaria de síntesis de estos glicanos (Fig. 2), de predominio O-glicosídico de tipo mucínico simple y complejo que ocurren en el aparato de Golgi, a modo postraduccional. Durante la carcinomatosis primaria en glándula mamaria, observamos el predominio de estructuras sialiladas que luego pasan a ser de menor intensidad en la metástasis. Algunos resultados preliminares (no publicados aún) nos han permitido establecer un patrón de la sialilación en la metástasis con la finalidad de establecer la participación e importancia de diversas estructuras

glicosídicas. Por otro lado, ensayos enzimáticos nos han permitido establecer la prevalencia de estructuras glicopeptídicas en la metástasis a cerebro, sobre otras formas glicolípídicas.

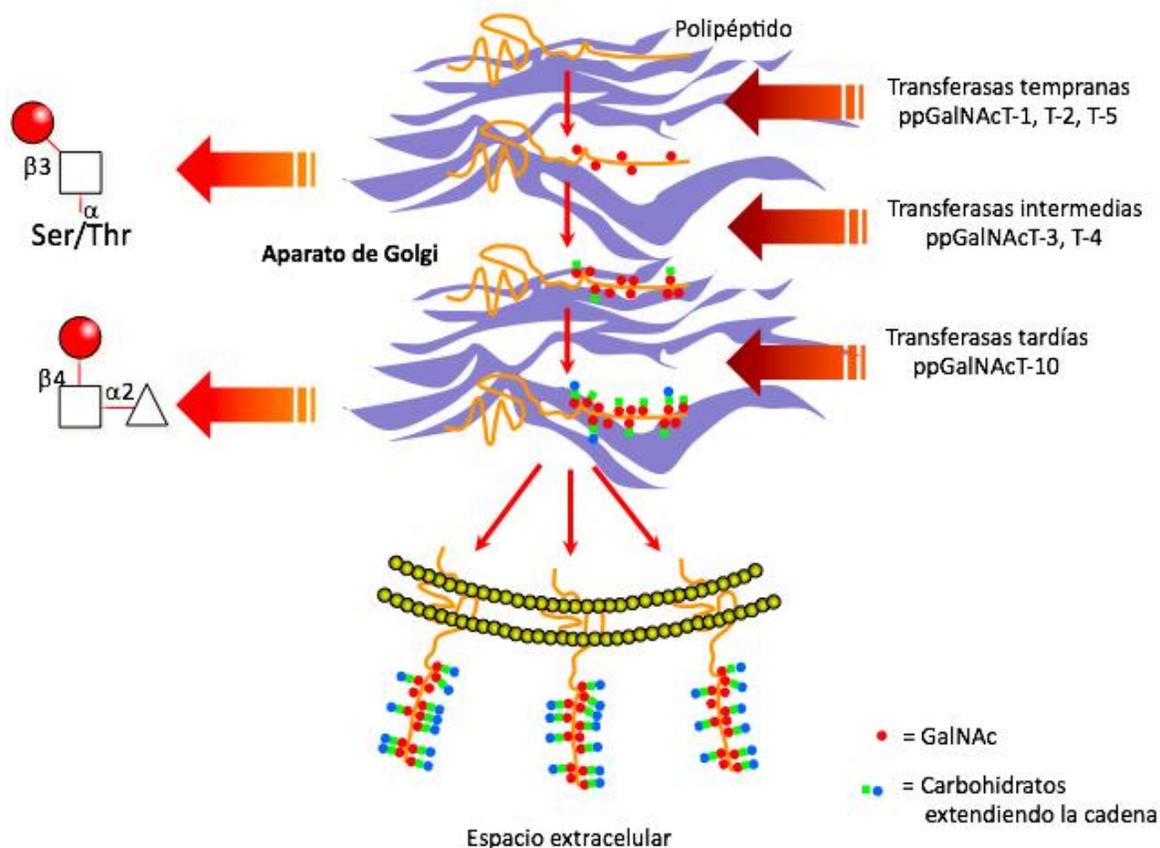


Figura 2. Síntesis de O-glicopéptidos de tipo mucínico postraduccionalmente. La relevancia es la búsqueda de las transferasas específicas y su activación a nivel génico para la modificación de este tipo de glicanos.

Conclusiones

Es probable que exista una razón por la que las células tumorales con potencial altamente metastásico sobre-expresen a galectina-3 y al antígeno disacarídico *Thomsen-Friedenreich* y otras estructuras O-glicosídicas complejas en forma co-expresiva (Fig. 3). Las células tumorales poseen diversos mecanismos para regular esta sobre-expresión, por esta razón, la identificación de las vías asociadas a estos eventos dependientes de estímulo celular, permitirá

establecer futuras herramientas diagnósticas precoces o blancos terapéuticos que si bien evitarían la migración a distancia, podrían también modificar la conducta celular en la metástasis ya establecida y ofrecer ventajas terapéuticas. Aún falta mucho camino por recorrer, y existen más estructuras sacarídicas que estarían participando a la par de las que hemos descrito, motivo por el que nuestro trabajo se enfocará en el análisis de otros glicanos como el ácido siálico en sus diferentes formas de expresión y unión, que en conjunto ofrecen la ventaja celular de evadir el reconocimiento inmunológico, el potencial migratorio y metastásico celular, la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, etc. Además que la sialilación regula la inter-relación entre galectina-3 y sus ligandos particularmente en la progresión tumoral mamaria [38] al enmascarar sitios potenciales de unión.

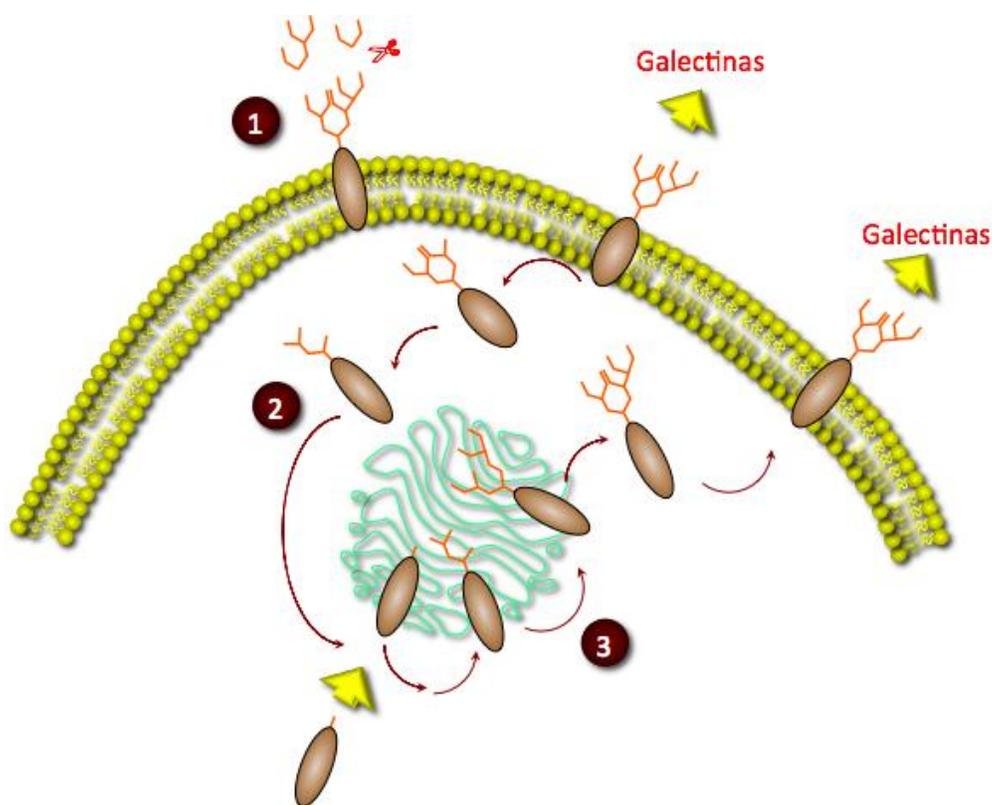


Figura 3. Rutas probables de postraducción de glicoproteínas y glicopéptidos en células tumorales metastásicas. 1, activando sialidasas que expongan residuos lactosamínicos o Gal; 2, reciclando glicopéptidos o glicoproteínas de membrana al aparato de Golgi; 3, neosintetizando glicoconjugados truncados específicos. Galectina-3 podría ser un factor de estímulo para la activación de cualquiera o más de estas rutas.

Referencias

1. Hakomori, S. (2002) *PNAS*. **99**: 10231-10233.
2. Couldrey, C., Green, J.E. (2000) *Breast Cancer Res.*, **2**: 321-323.
3. Springer, G.F., Desai, P.R., Ghazizadeh, M., Tegmeyer, H. (1995) *Cancer Detect Prev*. **19**: 173-182.
4. Springer, G.F. (1995) *Crit Rev Oncogen*. **6**: 57-85.
5. Van den Steen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Openakker, G. (1998) *Crit Rev Biochem Mol Biol*. **33**: 151-208.
6. Martensson, S, Levery, S.B., Fang, T.T., Bendiak, B. (1998) *Eur J Biochem*. **258**: 603-622.
7. Fonseca, I., Costa Rosa, J., Felix, A., Therkildsen, M.H., Soares, J. (1994) *Histopathol*. **25**: 537-543.
8. Cao, Y., Stosiek, P., Springer, G.F., Karsten, U. (1996) *Histochem Cell Biol*. **106**: 197-207.
9. Glinsky, V.V., Huflejt, M.E., Glinsky, G.V., Deutscher, S.L., Quinn, T.P. (2000) *Cancer Res*. **60**: 2584-2588.
10. Lis, H., Sharon, N. (1986) *Ann Rev Biochem*. **55**: 35-67.
11. Raz, A., Lotan, R. (1987) *Cancer Metastasis Rev*. **6**: 433-452.
12. Zou, J., Glinsky, V.V., Landon, L.A., Matthews, L., Deutscher, S.L. (2005) *Carcinogen*. **26**: 309-318.
13. Shigeoka, H., Karsten, U., Okuno, K., Yasutomi, M. (1999) *Tumour Biol*. **20**: 139-146.
14. Takenaka, Y., Fukumori, T., Raz, A. (2004) *Glycoconj J*. **19**: 453-549.
15. Le Marer, N., Hughes, R.C. (1996) *J Cell Physiol*. **168**: 51-58.
16. Matarrese, P., Fusco, O., Tinari, N., Natoli, C., Ciu, F.T., Semeraro, M.L., Malorni, W., Iacobelli, S. (2000) *Int J Cancer*. **85**: 545-554.
17. Mazurek, N., Byrd, J.C., Sun, Y., Hafley, M., Ramirez, K., Burks, J., Bresalier, R.S. (2012) *Cell Death Differ*. **19**: 523-533.
18. Zhao, Q., Guo, X., Nash, G.B., Stone, P.C., Hilken, J., Rhodes, J.M., Yu, L-G. (2009) *Cancer Res*. **69**: 6799-6806.
19. Choi, J.Y., Cho, S.I., Do, N.Y., Kang, C.H., Lim, S.C. (2010) *J Otolaryng Head Neck*. **39**: 28-34.
20. Levy, R., Biran, A., Poirier, F., Raz, A., Kloog, Y. (2011) *PLoS ONE*. **6**: e27490. doi:10.1371/journal.pone.0027490
21. Levy, R., Grafi-Cohen, M., Kraiem, Z., Kloog, Y. (2010) *Mol Cancer Ther*. **9**: 2208-2219.
22. Tavares de Oliveira, J., de Matos, A.J.F., Gomes, J., Vilanova, M., Hespanhol, V., Manninen, A., Rutteman, G., Chammas, R., Gärtner, F., Bernardes, E.S. (2010) *Glycobiology*. **20**: 1341-1352.
23. Saravanan, C., Liu, F.T, Gipson, I.K., Panjwani, N. (2009) *J Cell Sci*. **15**: 3684-93.
24. Seok-Jun, K., Ji-Young, S., Kang-Duck, L., Young-Ki, B., Il-Ju, C., Seok Hee, P., Kyung-Hee, C. (2011) *PLoS ONE* **6**: e25103 doi:10.1371/journal.pone.0025103
25. Yuan-Guo, W., Seok-Jun, K., Jung-Hwan, B., Hyun-Woo, L., Seo-Young, J.,

- Kyung-Hee, C. (2012) *Exp Mol Med*. **44**: 387-393.
26. Yamamoto-Sugitani, M., Kuroda, J., Ashihara, E., Nagoshi, H., Kobayashi, T., Matsumoto, Y., Sasaki, N., Shimura, Y., Kiyota, M., Nakayama, R., Akaji, K., Taki, T., Uoshima, N., Kobayashi, Y., Horiike, S., Maekawa, T., Taniwaki, M. (2011) *PNAS*. **108**: 17468-17473.
 27. Markowska, A.I., Liu, F-T., Panjwani, N. (1993) *J Exp Med*. **207**: 1981-1993.
 28. Hsu, D.K., Chen, H-Y., Liu, F-T. (2009) *Immunol Reviews*. **230**: 114-127.
 29. Liu, F-T., Ravinovich, G.A. (2005) *Nat Rev Cancer*. **5**: 29-41.
 30. Carpi, A., Rossi, G., Coscio, G., Lervasi, G., Nicolini, A., Carpi, F., Mechanick, J.I., Bartolazzi, A. (2010) *Ann Med*. **42**: 70-78.
 31. Kim, M.K., Sung, C.O., Do, I-D, Jeon, H-K, Song, T.J., Park, H.S., Lee, Y-Y., Kim, B-G., Lee, J-W., Bae, D-S. (2011) *Int J Clin Oncol*. **16**: 352-358.
 32. Buljan, M., Sítum, M., Tomas, D., Milošević, M., Krušlin, B. (2011). *JEADV*. **25**: 1174-1181.
 33. Canesin, G., Gonzalez-Peramato, P., Palou, J., Urrutia, M., Córdón-Cardo, C., Sánchez-Carbayo, M. (2010) *Tumor Biol*. **31**: 277-285.
 34. Bisinoto Borges, C., Soares Bernardes, E., Latorraca, E.F., Paixão Becker, A., Neder, L., Chammas, R., Roque-Barreira, M.C., Machado, H.R., Santos de Oliveira, R. (2011) *Childs Nerv Syst*. **27**: 253-257.
 35. Ege, Ç.B., Akbulut, M., Zekioglu, O., Özdemir, N. (2011) *Arch Gynecol Obstet* **284**: 1231-1239.
 36. Mayoral, M.A., Mayoral, C., Meneses, A., Villalvazo, L., Guzman, A., Espinosa, B., Ochoa, J.L., Zenteno, E., Guevara, J. (2008) *Cancer Invest*. **26**: 615-623.
 37. Sawke, N.G., Sawke, G.K. (2010) *Indian J Cancer*. **47**: 452-457.
 38. Tavares de Oliveira, J., de Matos, A-J., Santos, A.L., Pinto, R., Gomes, J., Hespanhol, V., Chammas, R., Aki, M., Bernardes, E.S., Reis, C.A., Rutteman, G., Gärtner, F. (2011) *Int J Dev Biol*. **55**: 823-834.

Semblanza del Dr. Miguel Angel Mayoral Chávez



Es investigador en la Facultad de Medicina y Cirugía de la UABJO. Obtuvo el grado de Doctor en Ciencias Médicas y Biológicas por la misma Facultad; previamente cursó la Licenciatura en la misma Facultad y obtuvo la Maestría en Ciencias en Ing. Bioquímica en el Instituto Tecnológico de Oaxaca. Ha sido Jefe de áreas básicas, Coordinador de la Maestría en Ciencias Médicas y Biológicas, y Jefe del Laboratorio de Bioquímica; actualmente es Coordinador del Doctorado en Ciencias Médicas y Biológicas en la Facultad de Medicina y Cirugía de la UABJO.

Cuenta con 9 artículos científicos en revistas internacionales indizadas y arbitradas, 2 en revistas nacionales indizadas, 16 artículos de divulgación nacionales, y 3 capítulos de libros nacionales y 1 internacional.

Es miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, la Asociación Panamericana de Oftalmología, The Science Advisory Board, la Academia Ciencias de Nueva York, la Sociedad Mexicana de Bioquímica y fundador de la Sociedad Latinoamericana de Glicobiología. Actualmente es candidato al Sistema Nacional de Investigadores (SNI); Miembro titular del Comité Editorial de la Revista de Evidencia e Investigación Clínica, del Colegio de Investigadores en Ciencias de la Salud de Oaxaca, y revisor invitado de la revista *Complementary Therapies in Medicine*, Ed. Elsevier, Inglaterra.

Además de investigación, participa en la docencia impartiendo cursos en la Licenciatura de Médico Cirujano, y en el posgrado de la Facultad de Medicina y Cirugía de la UABJO. Ha dirigido 1 tesis de Licenciatura, 4 de Maestría y 5 de Doctorado. Participa como miembro de comités tutorales en los Posgrados en Ciencias de la Facultad de Medicina y Cirugía de la UABJO, de la Facultad de Ciencias de la UAEM; y de la BUAP. Ha participado de diversos foros como ponente tanto nacionales como internacionales, y ha impartido cursos como profesor invitado nacionales e internacionales.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 196 – 212, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

LAS CRÓNICAS DE *GIARDIA*. EL PARÁSITO, LA MOLÉCULA Y EL FÁRMACO

THE CRONICLES OF *GIARDIA*. THE PARASITE, THE MOLECULE AND THE DRUG

Gabriel López-Velázquez, Horacio Reyes-Vivas, Gloria Hernández-Alcántara, Ignacio de la Mora-de la Mora, Sergio Enríquez-Flores, Carmen Ortíz, Adriana Castillo-Villanueva, Sara Méndez, Itzhel García-Torres, Jaime Marcial, Angélica Torres, Jesús Oria-Hernández, América Vanoye-Carlo, Saúl Gómez-Manzo

Laboratorio de Bioquímica Genética. Instituto Nacional de Pediatría.
Insurgentes Sur 3700-C, Coyoacán, C.P. 04530, México D.F.
glv_1999@yahoo.com

Resumen

Giardia lamblia es un parásito sumamente interesante desde los puntos de vista evolutivo y médico. Evolutivamente se ha prestado a gran controversia ya que, durante mucho tiempo se creyó que era el eslabón perdido entre los procariontes y los eucariontes. Sin embargo, paulatinamente se ha ido demostrando que posee prácticamente todas las características diagnósticas de los eucariontes actuales, aunque se considera aún como de divergencia temprana. Es el parásito causante de la giardiasis, enfermedad que afecta a todos los vertebrados, incluyendo el humano. Esta enfermedad afecta principalmente a los

niños y actualmente ha desarrollado resistencia a todos los medicamentos que existen para combatirla. Nuestro grupo de trabajo ha participado en la generación de conocimiento acerca de la caracterización de *G. lamblia* dentro de los eucariontes, pero nos hemos enfocado más a la búsqueda de blancos terapéuticos para el diseño de fármacos anti-giardíacos.

Palabras Clave: Giardia, giardiasis, triosafosfato isomerasa.

Abstract

Giardia lamblia is a parasite extremely interesting from the evolutionary and medical points of view. Evolutionarily has been paid to much controversy because, for a long time was believed to be the missing link between prokaryotes and eukaryotes. However, it has gradually showing that owns virtually all diagnostic characteristics of current eukaryotes, but is still considered as early divergence. Is the parasite that causes giardiasis, a disease that affects all vertebrates, including humans. This disease mainly affects children and currently has developed resistance to all drugs used on it. Our group has participated to get knowledge about the characterization of *G. lamblia* in eukaryotes, but we have focused more on finding therapeutic targets for anti-giardial drug design.

Keywords: Giardia, giardiasis, triosephosphate isomerase.

EL PARÁSITO

Breviario de la clasificación de los seres vivos

Desde tiempos inmemorables, el hombre ha desarrollado métodos de clasificación de los seres animados e inanimados de su entorno. Aristóteles (384-322 a.C.) dividió los animales en *enaima* o animales de sangre roja, vertebrados y *anaima* o animales de sangre azul o invertebrados. Del mismo modo, un discípulo suyo Teofrasto (370-285 a.C.) dividió a las plantas en cuatro grupos diferentes: árboles, arbustos, matas y hierbas e indicó para cada tipo de planta una frase larga que la definía. Plinio el Viejo (23-79 d.C.), dividía los animales en tres grupos diferentes: de aire, de tierra y de agua. Estas clasificaciones en su mayoría fueron basadas en la utilidad de los seres vivos; así, San Agustín (s. IV) dividía a los animales en tres grupos en función de su relación con el hombre: útiles, peligrosos y superfluos.

En el siglo XVII, tras la inclusión de aspectos morfológicos, John Ray introduce el concepto de *especie* basándose en la homogeneidad anatómica y morfológica. Ray describió 19,000 plantas; para identificar cada una utilizó una frase en latín, siguiendo un esquema que ya usó Teofrasto, en la que se enumeraban sus principales características; este sistema se denomina sistema polinomial. Al final de ese siglo aparece el concepto de *género*, que incluía a aquellas especies semejantes en un mismo grupo. Carl von Linné o Linneo (1707-1778), crea el sistema moderno de clasificación y describe varios miles de especies. Sin duda, su mayor contribución fue la invención del sistema de clasificación binomial (*bi nomen*= dos nombres); este tiene un primer nombre que hace referencia al género y un segundo que identifica la especie. El nombre del género debe ir con mayúscula y el nombre de la especie (o epíteto específico) es con minúscula. Ambos nombres deben ir escritos en cursiva o subrayados (p. ej. Para la especie *Giardia lamblia*; *Giardia* corresponde al género y *lamblia* al epíteto específico).

Hoy en día existen varias clasificaciones; sin embargo, se ha reconocido que la mayor discontinuidad que hay entre los seres vivos es la de presentar núcleo celular, lo cual los divide en procariontes y eucariontes. En 1971 Lynn Margulis propuso la teoría de la endosimbiosis en serie, la cual explica la aparición de la célula eucariótica por asimilación simbiótica de varias bacterias con habilidades diferenciadas [1]. Hasta 1977, el reino se consideraba la categoría sistemática más amplia. Sin embargo, Carl Woese y sus colaboradores [2] propusieron la categoría de Dominio para incluir a tres grandes líneas evolutivas: Eubacteria (Bacterias), Archaea (Arqueobacterias) y Eukarya (Eucariotas). En el sistema de Woese, Archaea y Eubacteria son dominios distintos de organismos procariotas. El dominio Eukarya agrupa, según esta clasificación, a los restantes reinos de organismos eucariontes. En 1990, nuevamente Woese propone que, para clasificar a los organismos vivos dentro de estos tres dominios, se requiere del uso de marcadores moleculares y propone al ARN ribosomal como un excelente ejemplo para ello [3]. En 1989, Mitchell Sogin y sus colaboradores se basan en la secuencia del ARNr 16S y proponen a *G. lamblia* como el organismo que posee las características ancestrales de los eucariontes y procariontes [4].

El linaje más “antiguo” de los eucariontes ¿*Giardia*?

Antes que nada, se debe aclarar que es incorrecto utilizar el término antiguo al hacer mención a relaciones filogenéticas. Lo más correcto es divergencia temprana; haciendo alusión a la rama del árbol filogenético que divergió antes que otra u otras ramas en la historia natural de un grupo o grupos de seres vivos.

G. lamblia fue ganando adeptos que la proponían como el eucarionte de divergencia más temprana e incluso, fue clasificada por Cavalier-Smith en 1989 dentro del grupo llamado Archezoa [5], por no poseer los organelos característicos de los eucariontes superiores, entre ellos mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi [6]. La hipótesis más temeraria a este respecto era que *Giardia* representaba un linaje de los eucariontes previo a los eventos de endosimbiosis que dieron origen a las células eucariontes. Aunado a lo anterior, utilizando marcadores moleculares diferentes del ARNr, como son la fibrilarina [7] y la V/F/A-ATPasa [8], los análisis filogenéticos soportaban la posición basal de *Giardia* en el árbol ancestral de los eucariontes. Aumenten a ello que, para el año 2001 todavía se creía que no poseía intrones ni nucléolo [9].

No obstante, *Giardia* posee núcleo celular (dos en el trofozoito y cuatro en el quiste) lo cual la ubica sin problema en el dominio Eukarya; esto, a pesar de los datos anteriores y de otros que la asemejan a las bacterias (p. ej. alto contenido de G + C en su genoma y la complementariedad de genes con bacterias) [10].

***Giardia*; el eucarionte que confirma la regla**

El hecho de ser el centro de atención como presunto eslabón perdido entre los procariontes y eucariontes propició un sinnúmero de estudios que, a diferencia de apoyar esta hipótesis, empezaron a desbancar a *Giardia*. Uno de los primeros datos fue el descubrimiento de que *G. lamblia* presenta un aparato de Golgi característico cuando las células empiezan a enquistarse [11].

Irónicamente, el mismo Sogin, quien fue uno de los que inició el debate al respecto de la posición basal de *Giardia*, junto con un grupo de colaboradores, describe la existencia de intrones en este parásito [12]. Casi de inmediato, Tovar y colaboradores asestan uno de los golpes más duros hacia la hipótesis del eslabón perdido, describiendo la presencia de vestigios de mitocondrias (mitosomas) en *Giardia* [13].

Actualmente se sabe que *Giardia* posee una maquinaria para el procesamiento de la información genética del tipo de los eucariontes superiores o aún más compleja. La existencia de intrones canónicos y no canónicos, la presencia de RNAs pequeños nucleares (snRNAs), genes separados en diferentes sitios del genoma y otros descubrimientos, la ubican como un organismo con maquinaria molecular compleja e interesante [14, 15].

Uno de los aspectos en los que la comunidad científica seguía muy renuente era en la presencia de nucléolo. La mayoría de los trabajos incluían una advertencia en cuanto a la ausencia de nucléolo en *Giardia*; esto era de extrañar ya que el resto de las células eucariontes estudiadas sí presentaban nucléolos. En 2008, tuvimos la oportunidad de demostrar mediante estudios morfológicos y moleculares que *G. lamblia* tiene nucléolo, de hecho el más pequeño reportado hasta la fecha [16]. Esta característica de *Giardia* ya es ahora aceptada y ha sido confirmada por otros grupos [17, 18]. Esta situación implica además que el nucléolo debe considerarse como una característica diagnóstica de los eucariontes.

***Giardia*: el parásito que sonrío.**

Giardia lamblia (sinónimo de *Giardia duodenalis* y *Giardia intestinalis*), fue descrito por primera vez en 1681 por Antonie van Leeuwenhoek cuando revisaba sus propias evacuaciones diarreicas [19]; es un microorganismo eucarionte, protozario y flagelado, que presenta dos estados de vida: trofozoito (estado vegetativo) y quiste (estado infectivo). El trofozoito (aprox. 12 -15 μm de largo x 5 - 9 μm de ancho) es binucleado con al menos un nucléolo por cada núcleo [16]. El citoesqueleto incluye un cuerpo medio, y seis pares de flagelos. En el citoplasma se encuentran vacuolas lisosomales, ribosomas y gránulos de

glucógeno. El complejo de Golgi es visible en trofozoitos en enquistamiento y en el trofozoito solo se llegan a ver pilas de membranas [9, 20].

No se ha encontrado cuál es la función del cuerpo medio, pero al hacer una tinción con Giemsa [17], su forma característica asemeja una sonrisa en la parte media del trofozoito, con los dos núcleos como si fueran ojos (revisar la siguiente liga: http://biology.unm.edu/ccouncil/Biology_203/Summaries/Protists.htm).

***Giardia* obtiene la mayor parte de su energía mediante la glucólisis**

Giardia es microaerofílico (solo soporta bajas concentraciones de oxígeno) y no lleva a cabo fosforilación oxidativa debido a que no tiene mitocondrias [9, 13], motivo por el cual su fuente principal para la generación de ATP es la glucólisis [21]. No obstante, otros trabajos sugieren que el metabolismo de la arginina también juega un papel importante en la generación de energía y en el encendido de la maquinaria relacionada con las proteínas de superficie o VSPs [17, 22]; por tal motivo, es importante no dejar de lado este metabolismo en la búsqueda de blancos terapéuticos. Sin embargo, las estrategias para bloquear la vía glucolítica en *Giardia* ofrecen la oportunidad de propiciar que el parásito siga consumiendo energía y que tenga un déficit de producción de la misma, en conjunto con la acumulación de metabolitos secundarios que resultan tóxicos para el microorganismo. Este parásito ha generado resistencia a todos los medicamentos que actualmente se prescriben y además presenta un fenómeno de variabilidad antigénica, mediante la expresión de proteínas de superficie (VSP), que le ayudan a evadir el sistema inmune de sus hospederos. Lo anterior soporta la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos en las enzimas de las vías metabólicas de generación de ATP para generar fármacos anti*giardiásicos* [22, 23].

La giardiasis es una enfermedad olvidada pero con alto potencial dañino

G. lamblia es causante de la giardiasis y habita en el intestino delgado de los humanos y otros vertebrados. La giardiasis es la enfermedad más común de diarrea no bacteriana y no viral, con una distribución cosmopolita, 280 millones de casos sintomáticos y

unos 500,000 nuevos casos cada año [24]. En los países desarrollados, *Giardia* es también la causa más común de brotes de enfermedades diarreicas transmitidas por el agua, debido a su consumo por el humano [25]; de manera similar afecta fuertemente a los animales domésticos [26]. La giardiasis afecta más en los tres primeros años de vida y en personas desnutridas o inmunodeficientes [24, 27-30]. Se ha observado aumento en la incidencia de giardiasis en los niños de guarderías, lo que ha dado lugar a su designación como una enfermedad infecciosa reemergente en países desarrollados [30]. Debido a que se transmite por el agua contaminada, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de E.U., han clasificado a *Giardia* como un organismo susceptible de usarse para bioterrorismo en categoría B.

Esta situación ha propiciado el desarrollo de nuevas terapias de atención, la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, el desarrollo de nuevos fármacos y métodos preventivos que incluyen el desarrollo de vacunas.

LA MOLÉCULA

La TIM de *Giardia lamblia* es inusual

La Triosafosfato Isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica ubicua que cataliza la isomerización reversible entre (R)-gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Su cinética de reacción está bien caracterizada y existen más de 14 estructuras en 3D de diferentes especies. Nuestro grupo de trabajo cristalizó y resolvió por primera vez la estructura de la TIM de *G. lamblia* (GITIM) y a partir de ello propusimos, entre otras cosas, la capacidad que esta enzima tiene para formar oligómeros mayores que el clásico dímero hasta entonces descrito para la mayoría de organismos (Fig. 1) [32].

La estructura tridimensional de los monómeros de TIM se denomina barril- α/β (Fig. 2); los residuos del sitio activo de todas las TIMs conocidas están situados en la región central del barril y pertenecen a la misma cadena principal. La mayoría de TIMs descritas hasta ahora son homodímeros; sin embargo, algunas TIM de organismos hipertermofílicos tienen

una estructura cuaternaria diferente que, aparentemente, está relacionado con su estabilidad térmica. Por ejemplo, la TIM de *Pyrococcus woesei* y *Methanothermus fervidus* son enzimas tetraméricas. En *Thermotoga neapolitana* y *T. maritima*, la enzima es un tetrámero que se fusiona con una fosfoglicerato cinasa.

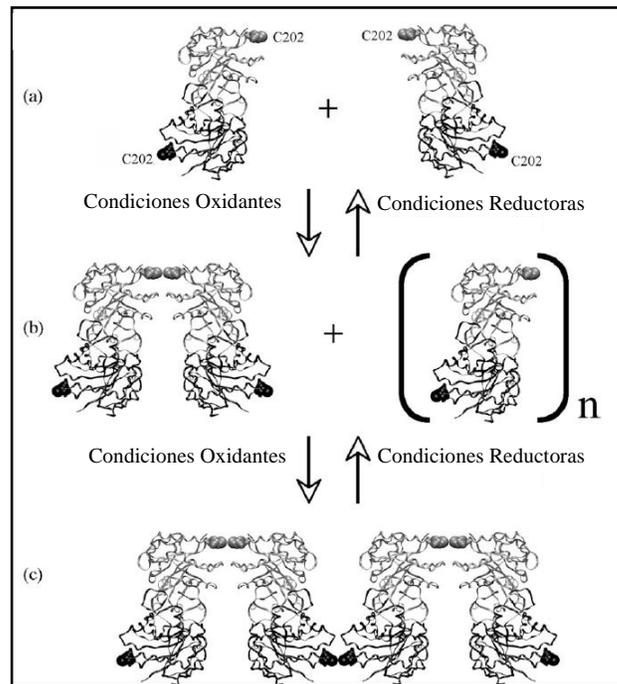


Figura 1. Propuesta de oligomerización de GITIM mediante la formación de puentes disulfuro entre las Cys 202. a) Dímeros, b) tetrámeros, c) oligómeros mayores al tetrámero.

Esta enzima en *Giardia* presenta peculiaridades que la hacen muy especial ya que se ha demostrado que es la única TIM de organismos mesofílicos que puede presentar tetrámeros [33]. Aunado a ello, dichos tetrámeros se generan mediante enlaces covalentes tipo puentes disulfuro entre las cisteínas en la posición 202 de cada par de dímeros participantes en el tetrámero (Fig. 1) [32]. La formación de estos puentes disulfuro en conjunto con la formación de puentes disulfuro intracatenarios entre las cisteínas 222 y 228, regula la actividad catalítica del oligómero en cuestión. La construcción de enzimas mutantes sencillas de cada uno de los residuos de cisteínas presentes en la molécula nos permitió demostrar estos datos [32]. Se ha planteado la hipótesis de que dicha condición puede estar

vinculada con el proceso de infección, en el cual *Giardia* llega como quiste (su GITIM se encuentra prácticamente inactiva y acumulada en oligómeros mayores al dímero) y al desenquistarse, introduce cisteínas a su citoplasma, lo cual genera un ambiente reductor que dispara la formación de dímeros altamente activos [32].

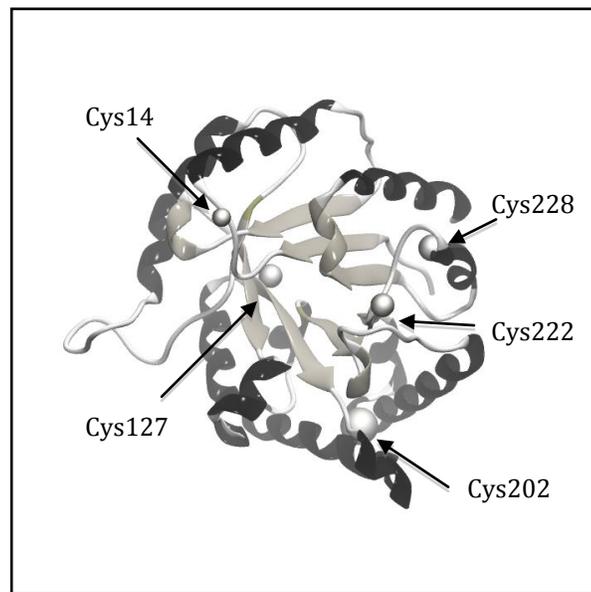


Figura 2. Representación de la estructura tridimensional de uno de los dos monómeros presentes en GITIM. También se señalan las cisteínas que cada monómero contiene (PDB 2DP3).

Otra característica peculiar en GITIM tiene que ver con la fluorescencia intrínseca generada por sus residuos de Trp. A diferencia de la mayoría de las proteínas que, cuando se someten a un análisis espectrofluorométrico, van perdiendo la fluorescencia conforme se van desnaturalizando, GITIM aumenta su fluorescencia en este proceso de desnaturalización. Este fenómeno se debe a que los cuatro Trp presentes en cada monómero de GITIM se encuentran apagados (*quenching*) debido a interacciones aromáticas y de otro tipo que se dan entre los aminoácidos adyacentes a ellos [34]. Hasta el momento no se ha logrado explicar el significado biológico que tiene este fenómeno en GITIM y es un campo abierto para su estudio.

La GITIM es una molécula blanco especie-específico

Varios grupos de trabajo han propuesto a la TIM de otros parásitos como blanco para el desarrollo de antiparasitarios y específicamente a la región de la interfase de la proteína, lugar donde se pueden encontrar diferencias con respecto a la TIM de humano (HuTIM) [35]. La Cys en posición 14 de estos parásitos ha sido el motivo de muchos estudios, ya que se ha señalada como un punto susceptible de ser blanco terapéutico porque en la HuTIM hay una Met en esa misma posición [36].

GITIM también presenta la Cys de interfase en posición 14 (Fig. 2); sin embargo, los estudios realizados con respecto a la formación de puentes disulfuro y su relación con los cambios de actividad enzimática en GITIM, nos hicieron voltear a ver hacia el papel que juegan otras cisteínas en el proceso de inactivación de esta enzima.

La cisteína (abreviada como Cys o C) es un α -Aminoácido, y presenta un grupo sulfhidrilo (-SH) muy reactivo; es por ello que la Cys es uno de los aminoácidos más reactivos. El grupo tiol de la Cys es nucleofílico y se oxida fácilmente; la reactividad aumenta cuando el tiol es ionizado y cuando el pH es cercano a neutro, es por ello que es muy fácil encontrar tioles reactivos en las células. Cuando dos grupos tiol forman un enlace covalente entre sí, a este se le denomina enlace o puente disulfuro; este se considera un enlace fuerte, contiene una energía de 60 kcal/mol, una longitud de 2.05 Å y tiene gran influencia en la estructura terciaria de las proteínas. Hay una gran cantidad de compuestos que pueden reaccionar con los grupos sulfhidrilo libres, y han sido extensamente utilizados como sondas para analizar el potencial que ciertas regiones de una proteína puede tener para el diseño de inactivadores específicos (para revisión, ver trabajos del grupo de Gómez-Puyou, del grupo de Balaram y los nuestros).

Utilizando diferentes compuestos reactivos a cisteínas (también conocidos como derivatizantes de cisteínas), logramos demostrar que la GITIM podía ser inactivada de manera especie-específica, ya que al incubar con compuestos como el DTNB (ácido bis-nitro benzoico), encontramos que HuTIM permanecía prácticamente sin cambios en su actividad,

mientras que GITIM se encontraba completamente inactiva (Fig. 3, panel izquierda); GITIM fue 180 veces más sensible a la inactivación por DTNB que lo que fue HuTIM [37].

Estos experimentos nos alentaron a seguir estudiando a esta enzima como un potencial blanco para el desarrollo de anti-giardíacos ya que cumple con la condición indispensable de inactivarse por compuestos que no afectan a la misma enzima en su hospedero [37].

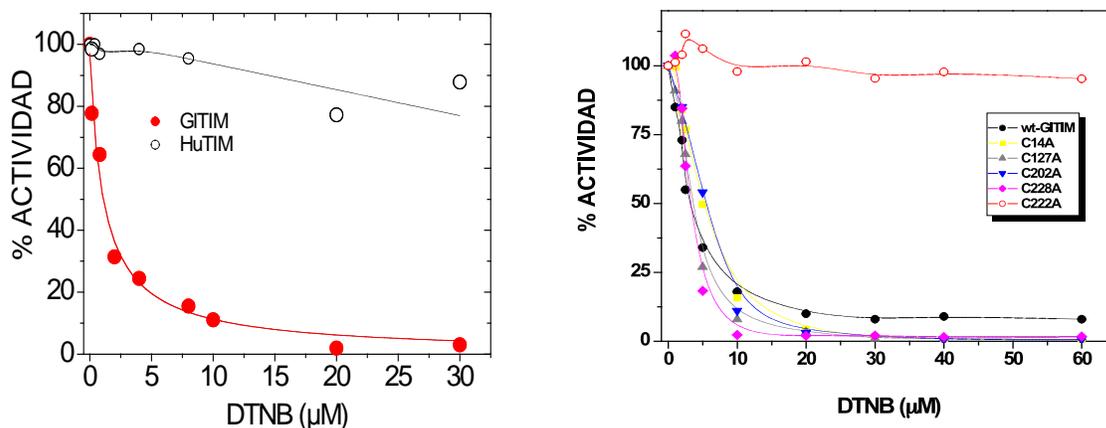


Figura 3. Ensayos de inactivación por derivatización con concentraciones crecientes de DTNB. Panel izquierda; Inactivación enzimática de GITIM y HuTIM. La inactivación mediante derivatización de cisteínas es especie-específica. Panel derecha; Inactivación enzimática con DTNB de mutantes sencillas de GITIM. El blanco principal es la Cys en posición 222.

La Cisteína en la posición 222: el talón de Aquiles en GITIM

Como ya se dijo, nuestros estudios previos que mostraron la importancia natural de la formación de puentes disulfuro nos obligaron a demostrar cuál o cuales Cys estaban siendo las responsables de este fenómeno de inactivación especie-específica. El experimento clave fue cuando se generaron por mutagénesis sitio dirigida, las 5 mutantes sencillas para cada una de las posiciones ocupadas por Cys en GITIM (se substituyó cada Cys por una Ala). En biología, una de las estrategias utilizadas para saber la función de algún componente es

aquella en la que quitamos el elemento en cuestión y corroboramos cuál es la función o el fenómeno faltante. Como se puede observar en la figura 3 panel derecha, todas las mutantes se inactivan de manera similar a la enzima nativa; sin embargo, aquella enzima mutante en la posición 222 conserva totalmente su actividad, por lo que se deduce que ésta es el blanco principal de inactivación en GITIM [23].

La derivatización de la Cys 222 de GITIM perturba la unión de ligando al sitio activo de la enzima.

Nuestros estudios con respecto a dilucidar el mecanismo por el cual se inactiva la GITIM mediante la modificación de una Cys que esta “lejos” del sitio activo, nos han llevado a proponer que los cambios que promueve la generación del aducto con la Cys 222. Mediante dinámica molecular propusimos que la afectación en esta zona promueve la pérdida de un puente de hidrógeno que da soporte a la Ser 216, la cual forma parte de los residuos 213-216 (YGGs) altamente conservados del asa 7, que a su vez afecta la conformación del asa 6 (asa catalítica) y de la hélice 7 (Fig. 4) [32]. Mediante ensayos cinéticos y de calorimetría logramos demostrar que la afectación en la región de la Cys 222 hace decrecer fuertemente la afinidad que tiene la enzima por su sustrato y el grado de perturbación esta relacionado con el tamaño y la polaridad del compuesto utilizado para la inactivación [23].

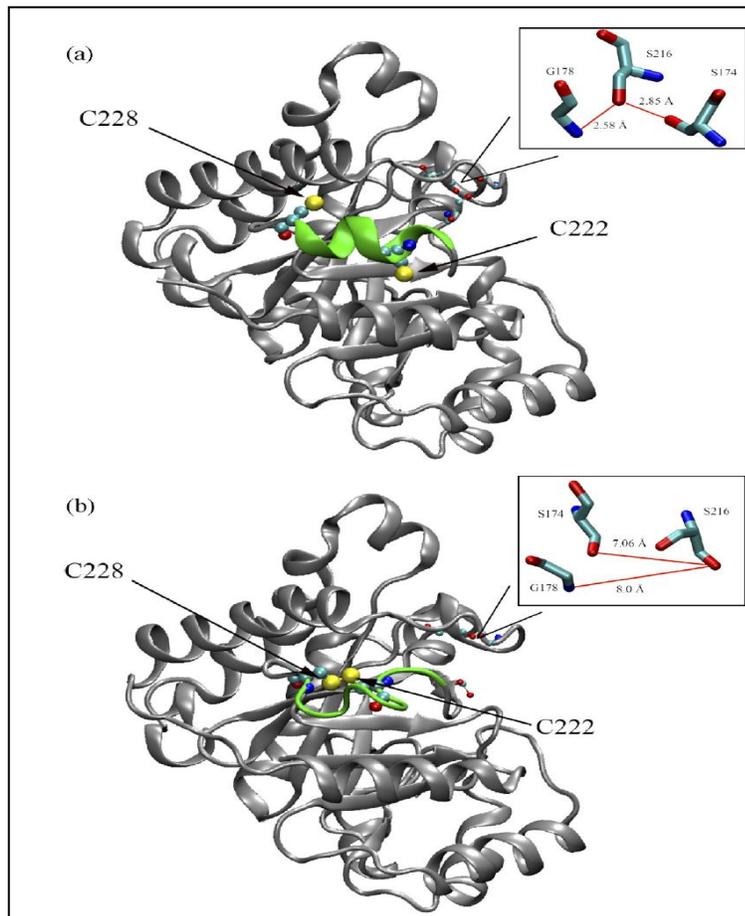


Figura 4. Dinámica molecular que muestra la afectación de la Estructura de GITIM mediante la formación de un puente disulfuro intracatenario entre las Cys 222 y 228. a) Sin puente disulfuro, b) con puente disulfuro.

EL FÁRMACO

Científico sin serendipias... Se lo lleva la corriente

Si bien es cierto que es indispensable todo un bagaje teórico y experimental para poder dar soporte a las aseveraciones que vemos plasmadas en un artículo científico, también es verdad que los eventos fortuitos que guían a un investigador suelen ser de mucha ayuda. No obstante, desde mi punto personal de vista, estas serendipias no son meramente eventos aleatorios; sino son el resultado de la conjunción de eventualidades más, el continuo proceso mental de aquellos que nos dedicamos a la ciencia. El hecho de

dormir, comer, soñar, en resumen, vivir pensando en el trabajo del laboratorio, nos permite estar atentos a aquellos eventos que aunque parecieran no estar relacionados con nuestra investigación, en realidad sí lo están. Dicho lo anterior, he de confesar que mi primer encuentro con el omeprazol fue por prescripción médica debido a la gastritis incubada durante mis estudios de licenciatura, maestría y doctorado; después me encontré con su fórmula estructural meramente por casualidad.

El omeprazol inactiva a GITIM mediante la modificación de la Cys 222

El omeprazol es uno de los más importantes inhibidores de bombas de protones (PPIs) e inhibe de forma irreversible la H^+K^+ ATPasa mediante la derivatización de su residuo de Cys 813 [38]. Debido a su semejanza estructural con los compuestos derivatizantes de cisteínas que ya habíamos trabajado y a su mecanismo de inhibición previamente descrito para otras enzimas, nos dimos a la tarea de probar su utilidad como un inactivador de GITIM y eventualmente como un nuevo anti-giardiasico. En este sentido, realizamos los ensayos de inactivación de GITIM vs HuTIM a concentraciones crecientes de omeprazol y pudimos corroborar que produce un efecto de inactivación especie-específico de manera similar a la que previamente reportamos para derivatizantes como el DTNB o el MTSCE (Carboxi etil metano tiosulfonato). De igual manera, al probar el omeprazol contra las mutantes de Cys de GITIM, pudimos corroborar que en ausencia de la Cys 222, GITIM no se inactiva [39].

El omeprazol inactiva la GITIM del trofozoito y tiene efecto anti-giardiasico aún contra cepas resistentes.

Procedimos a hacer ensayos de viabilidad celular en cultivos de trofozoitos de *G. lamblia* y encontramos que este compuesto mataba a los trofozoitos con una LD_{50} cercana a los 300 μ M [39]. Después de separar los trofozoitos sobrevivientes a la exposición a metronidazol, estos fueron permeabilizados y la actividad residual de la GITIM celular fue cuantificada por espectrofotometría; es interesante notar que la inactivación de GITIM de estos trofozoitos fue relativamente proporcional al porcentaje de muerte celular registrado

[39]. Todos estos experimentos se repitieron con cepas de *G. lamblia* resistentes a metronidazol y a nitazoxanide y los resultados fueron similares (publicación en proceso).

Observaciones Finales

Hay un modo de que me hagas completamente feliz, amor mío... muérete (Jaime Sabines, poeta chiapaneco)

Todo lo anterior nos llevó a publicar algunos artículos científicos y al registro de una patente de nuevo uso como anti-giardiasico del omeprazol y sus derivados (MX/a/2008/012900). Lo más importante en estos trabajos es haber estado abiertos a describir e interpretar los datos sin sesgo pero, al mismo tiempo ver los experimentos con una visión integral en cuanto a la importancia biológica, médica, económica, etc. Es irónico que nuestro objetivo final sea matar a un organismo que queremos tanto en el laboratorio y que nos ha enseñado tanto acerca de los sistemas biológicos.

Referencias

1. Margulis L. (1971). *Sci Am.* **225**(2):48-57
2. Woese CR, Fox GE. (1977). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**(11):5088-90.
3. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(12):4576-9.
4. Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA. (1989). *Science.* **243**(4887):75-7.
5. Cavalier-Smith T. (1989). *Nature.* **339**(6220):100-1.
6. Friend DS. (1966). *J Cell Biol.* **29**(2):317-32.
7. Narcisi EM, Glover VC, Fechheimer M. (1998) *J Euk Microbiol.* **45**:105–111.
8. Hilario E, Gogarten JP. (1988). *J Mol Evol.* **46**:703–715.
9. Adam RD. (2001). *Clin Microbiol Rev.* **14**(3):447-75.
10. Mowatt MR, Weinbach EC, Howard TC, Nash TE. (1994). *Exp Parasitol.* **78**:85–92.
11. Reiner DS, McCaffery M, Gillin FD. (1990). *Eur J Cell Biol.* **53**(1):142-53.
12. Nixon JE, Wang A, Morrison HG, McArthur AG, Sogin ML, Loftus BJ, Samuelson J. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(6):3701-5
13. Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM. (2003) *Nature.* **426**(6963):172-6.
14. Blumenthal T. (2011) *Curr Biol.* **21**(4):R162-3.
15. Korneta I, Magnus M, Bujnicki JM. (2012). *Nucleic Acids Res.* **40**(15):7046-65.
16. Jiménez-García LF, Zavala G, Chávez-Munguía B, Ramos-Godínez M del P, López-Velázquez G, Segura-Valdez M de L, Montañez C, Hehl AB, Argüello-García R, Ortega-Pierres G. (2008). *Int J Parasitol.* **38**(11):1297-304.

17. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. (2010). *Nat Rev Microbiol.* **8**(6):413-22.
18. Tian XF, Yang ZH, Shen H, Adam RD, Lu SQ. (2010). *Parasitol Res.* **106**(4):789-93.
19. Brian JF (2005). *MICROSCOPE* Vol **53**:4.
20. Gabriel López Velázquez, et. al., El Aparato de Golgi. En Biología Celular y Molecular, Jiménez García L.F. y Merchant Larios H. (Eds.), Pearson Educación Ed. (2003), pp. 445-476. ISBN: 970-26-0387-0.
21. Schofield PJ, Edwards MR, Kranz P. (1991). *Mol Biochem Parasitol.* **45**:39 – 48.22.
Schofield PJ, Edwards MR, Matthews J, Wilson JR. (1992). *Mol Biochem Parasitol.* **51**(1):29-36.
23. Enríquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernández-Alcántara G, Oria-Hernández J, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Hernández G, de la Mora-de la Mora I, Castillo-Villanueva A, García-Torres I, Méndez ST, Gómez-Manzo S, Torres-Arroyo A, López-Velázquez G, Reyes-Vivas H. (2011). *Proteins.* **79**(9):2711-24.
24. Lane S, Lloyd D. (2002). *Crit. Rev. Microbiol.* **28**,123–147.
25. Slifko TR, Smith HV, Rose JB. (2000) *Int J Parasitol*; **30**: 1379–1393.
26. Thompson RC, Smith A. (2011) *Vet Parasitol.* **182**(1):70-8.
27. Farthing MJG. (1989). *Quart J Med*; **70**(263):191–204.
28. de Weerth A, Gocht A, Seewald S, Brand B, van Lunzen J, Seitz U, Thonke F, Fritscher-Ravens A, Soehendra N. (200). *Gastrointest Endosc.* **55**, 4:605-607.
29. Feitosa G, Bandeira AC, Sampaio DP, Badaro R, Brites C. (2001). *J Infect Dis.* **5**, 6:339-344.
30. Thompson RCA. (2000). *Int J Parasitol*; **30**: 1259–1267.
31. Rivero FD, Saura A, Prucca CG, Carranza PG, Torri A, Lujan HD. (2010). *Nat Med.* **16**(5):551-7
32. Reyes-Vivas H, Diaz A, Peon J, Mendoza-Hernández G, Hernández-Alcantara G, De la Mora-De la Mora I, Enriquez-Flores S, Dominguez-Ramirez L, Lopez-Velazquez G. (2007) *J Mol Biol.* **365**(3):752-63.
33. López-Velázquez G, Molina-Ortiz D, Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Peon-Peralta J, Yépez-Mulia L, Pérez-Montfort R, Reyes-Vivas H. (2004). *Proteins.* **55**(4):824-34.
34. Hernández-Alcántara G, Rodríguez-Romero A, Reyes-Vivas H, Peon J, Cabrera N, Ortiz C, Enríquez-Flores S, De la Mora-De la Mora I, López-Velázquez G. (2008). *Biochim Biophys Acta.* **1784**(11):1493-500.
35. Álvarez G, Aguirre-López B, Varela J, Cabrera M, Merlino A, López GV, Lavaggi ML, Porcal W, Di Maio R, González M, Cerecetto H, Cabrera N, Pérez-Montfort R, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. (2010). *Eur J Med Chem.* **45**(12):5767-72.
36. Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Mendoza-Hernández G, Gómez-Puyou A, Perez-Montfort R. (2008). *Biochemistry.* **47**(11):3499-506.
37. Enríquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernández-Alcántara G, De la Mora-De la Mora I, Gutiérrez-Castrellón P, Karvajal K, López-Velázquez G, Reyes-Vivas H. (2008). *Mol Biochem Parasitol*; **157**(2): 179-186.
38. Besancon M, Simon A, Sachs G, Shin JM. (1997). *J Biol Chem.* **272**(36):22438-46.
39. López-Velázquez G., Reyes-Vivas H. (2008). Patente de Nuevo Uso. México, MX/a/2008/012900.



Semblanza del Dr. Gabriel López Velázquez

Es Biólogo, Maestro en Ciencias (Biología Celular) y Doctor en Ciencias (Biológicas) por la Facultad de Ciencias de la UNAM. Predoctoral Fellow en Baylor College of Medicine. Diplomado en Alta Dirección de Entidades Públicas del INAP. Fue Jefe del Laboratorio de Bioquímica Genética y fundador del grupo de estudio de Estructura y Función de Proteínas en ese

laboratorio, así como Subdirector de Investigación en el Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Actualmente se desempeña como Investigador en Ciencias Médicas “D” y pertenece al SNI nivel 1. Tiene dos principales líneas de Investigación: Caracterización de blancos moleculares para el diseño de nuevos fármacos de importancia médica. Impacto del consumo de Fructanos en la salud del binomio madre-hijo.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 213 – 224, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS DE LA INTERACCIÓN DEL OXIDO NÍTRICO Y RADICALES LIBRES DE OXIGENO

PHYSIOPATHOLOGICAL IMPLICATIONS OF THE INTERACTION OF NITRIC OXIDE AND OXYGEN FREE RADICALS

Ana María Gámez Méndez, Amelia Ríos y Bruno Escalante

Unidad CINVESTAV Monterrey, Nuevo León México.

Resumen

La obesidad representa un serio problema de salud, que se asocia con enfermedades metabólicas, por otro lado el Óxido Nítrico es fundamental para la función renal y cardiovascular y cambios en su concentración plasmática se han asociado con la obesidad. En el presente estudio demostramos que alteraciones del óxido nítrico se presentan muy tempranamente en el desarrollo de la obesidad y que esto repercute en el desarrollo de patología renal. La presencia de radicales libres de oxígeno generados en la etapa inicial de la obesidad pueden ser muy importantes en la reducción de óxido nítrico. De tal manera que al presentarse un daño renal la reducción en la disponibilidad de óxido nítrico impide al tejido renal ajustar los cambios hemodinámicos para mantener la filtración glomerular adecuadamente dando como resultado el desarrollo prematuro de insuficiencia renal.

Palabras clave: obesidad, óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, daño renal, insuficiencia renal.

Abstract

Obesity is a serious health problem associated with the pathogenesis of various metabolic diseases. Nitric Oxide (NO) plays an important role in kidney function and altered NO levels have been associated with the pathogenesis of obesity. Therefore, we aimed to study whether an early stage of obesity contributes with progression of renal failure through further NO impairment.

Urine nitrites excretion, urine volume, and plasma BH4 were decreased. In HFD mice, 5/6 Np further increased BH2 and urine protein concentration, ROS levels, and eNOS mRNA expression. The decrease in BH4 plasma levels and urine nitrites excretion was accentuated. NO synthesis stimulation with the antioxidants + L-arginine treatment prevented all these changes. The early changes in NO metabolism are associated with an early stage of obesity. This effect on NO potentiates kidney damage development.

Key words: obesity, nitric oxide, oxygen reactive species, kidney failure, kidney insufficiency.

Introducción

Los radicales libres pueden ser definidos como moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o mas de un electrón sin par en el ultimo orbital molecular. La carencia de este electrón en su estructura molecular le confiere una altísima capacidad de reaccionar con otros elementos químicos en un intento por ocupar dicho espacio. Los radicales que se generan a partir de oxígeno representan el tipo de radicales que con mayor frecuencia se encuentran presentes en los tejidos biológicos y se conocen con el termino de Especies Reactivas de Oxígeno o Radicales Libres de Oxígeno. Sin embargo la oxidación de grupos amino o del óxido nítrico da origen a otro grupo de radicales conocidos como Especies Reactivas de Nitrógeno.

Ambas especies de radicales son productos normales del metabolismo celular como parte de procesos fisiológicos. Sin embargo el estrés oxidativo puede ser un factor muy importante en el desarrollo de estados patológicos. En efecto la presencia de especies reactivas de oxígeno en el tejido vascular ha sido

asociada con daño al tejido mencionado y es parte de los mecanismos fisiopatológicos de padecimientos como aterosclerosis, hipertensión arterial, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca.

Recientemente, nuestro grupo ha descrito mecanismos de interacción entre el óxido nítrico y los radicales libres en el desarrollo de la insuficiencia renal y la obesidad. En la literatura existen datos reportados en ratas en las cuales los modelos experimentales de insuficiencia renal, han sugerido que el desarrollo del daño renal está asociado a la producción de especies reactivas de oxígeno [1]. Dichos reportes han mostrado que en un modelo de insuficiencia renal mediante la extirpación de la masa renal, el aumento en la presión arterial y el desarrollo de la insuficiencia renal se acompaña de un aumento en la producción del marcador de peroxidación lipídica, el malondialdehído [2]. En modelos de daño renal por procesos inflamatorios como la glomerulonefritis, la generación de radicales libres se asocia con aumento de la actividad de la fosfatasa de NADPH [3].

Esta idea de que existe una relación entre los radicales libres y el daño renal se ve reforzada por experimentos en los cuales el uso de antioxidantes como tratamiento del daño renal previene el desarrollo inicial de la hipertensión arterial [4] y protege el tejido renal del daño y la disfunción celular [5, 6], muy probablemente mediante la protección de las células epiteliales del túbulo renal de la acción del estrés oxidativo [7]. Estas evidencias, usando modelos animales de daño renal, han sido apoyadas en estudios clínicos que han demostrado que los pacientes con insuficiencia renal muestran un aumento en diversos marcadores de estrés oxidativo [8, 9].

Estos estudios en conjunto apoyan fuertemente la idea de que las especies reactivas de oxígeno pueden ser las responsables del daño renal que desemboca en la insuficiencia renal. Existen varios mecanismos mediante los cuales las especies reactivas de oxígeno pueden inducir el daño renal, entre las que se

puede mencionar mecanismos de peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, lo que originaría un aumento en la permeabilidad membranal, o bien mediante daño en bombas membranales iónicas, alteraciones en la fosforilación oxidativa o bien paso del lisosoma al citoplasma de enzimas con actividad hidrolítica [5].

Por otro lado recientemente se ha reportado evidencia experimental de que alteraciones en el óxido nítrico puede estar asociado con el desarrollo del daño renal. Estos reportes han demostrado que la producción del óxido nítrico [11] así como la actividad de la sintasa endotelial del óxido nítrico [12] se encuentran reducidas en modelos experimentales de insuficiencia renal. Varios mecanismos han sido propuestos para apoyar estos hallazgos, como el hecho de que los inhibidores endógenos de la sintasa de óxido nítrico endotelial se acumulan [13] o que la captación del sustrato de dicha enzima, la L-arginina, se reduce [14] durante el desarrollo de la insuficiencia renal. Si bien es cierto que la reducción del óxido nítrico en el daño renal puede ser explicada mediante los mecanismos antes mencionados, también existe la posibilidad de que el óxido nítrico pueda ser oxidado por los radicales de aniones superóxido dando como resultado la generación de un nuevo radical, el peroxinitrito (Figura 1).

Aunque los reportes antes mencionados establecen una relación entre alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico y el desarrollo de daño renal probablemente mediante la generación de peroxinitrito, no queda claro si el ON amortigua los efectos del peroxinitrito o bien si el óxido nítrico es el responsable del daño celular ocurrido durante el desarrollo de la insuficiencia renal.

Mediante el uso de animales que carecen del gen que codifica para la enzima óxido nítrico endotelial, nosotros hemos podido demostrar, que en dichos animales la ausencia de óxido nítrico facilita el desarrollo de la insuficiencia renal caracterizado por una mayor excreción urinaria de proteína (Figura 2), este

aumento del daño renal en los animales sin el gen de la sintasa del óxido nítrico endotelial, se asoció a una mayor producción de radicales libres de oxígeno y peroxinitrito [15]. Datos similares han sido reportados por otros autores, sugiriendo el papel patogénico de los radicales libres de oxígeno y la reducción de óxido nítrico en el desarrollo de la insuficiencia renal [16,17].

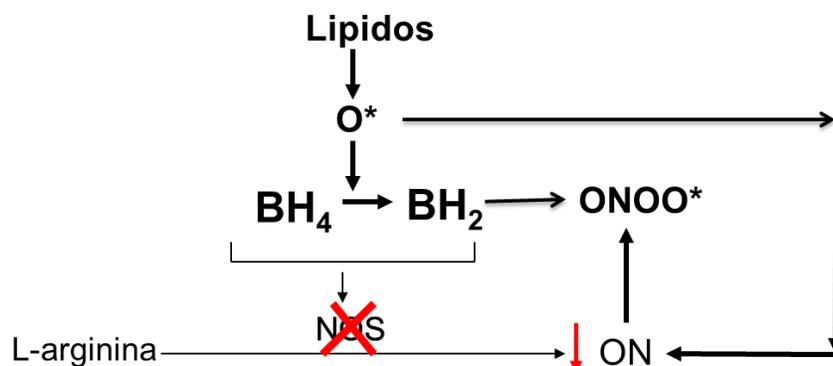


Figura 1. Metabolismo del óxido nítrico a partir de L-Arginina con los posibles sitios de acción de los radicales de oxígeno en la molécula de óxido nítrico o en la tetrahydrobiopterina (BH4).

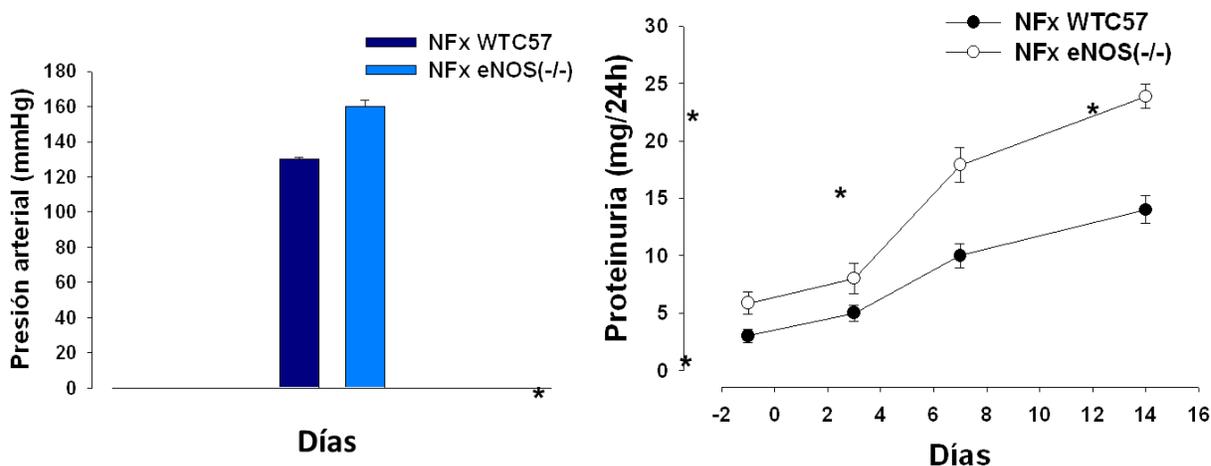


Figura 2. Desarrollo de insuficiencia renal (Presión arterial y Proteinuria) en animales control y animales deficientes del gen de la sintasa de óxido nítrico. Cada barra o punto representa la media de 6 experimentos.

El efecto de las especies reactivas de oxígeno puede deberse a la generación del peroxinitrito a partir del óxido nítrico, mecanismo que parece ser el más obvio. Sin embargo nuestros datos claramente demuestran que la ausencia de óxido nítrico en los animales carentes del gen de la sintasa de óxido nítrico, se asocia con aumento en la generación de anión superóxido y una deterioración más rápida de la función renal. Aún más la mortalidad en los animales con deficiencia de la sintasa de óxido nítrico es mayor en comparación con animales control [18]. Lo cual llevó a plantear la hipótesis de que ON actúa como un mecanismo protector en contra del daño celular producido por los radicales libres. De tal forma que el aumento del radical superóxido es antagonizado por el óxido nítrico, lo cual establece la relación O_2^-/ON como un mecanismo de relevancia para la modulación de la extensión del daño celular. La relación entre estos dos radicales puede ser alterada mediante la generación de radicales libres o bien por pérdida del ON. Esta hipótesis es apoyada por otros estudios en los cuales inhibición del metabolismo del ON potencia el daño renal [19] o bien que el uso de antioxidantes reduce la generación de radicales superóxido y aumenta el metabolismo del ON [17].

Recientemente hemos iniciado estudios en obesidad, la cual se ha demostrado está asociada a numerosos problemas cardiovasculares y renales. Alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico en obesos han sido asociadas a la patogénesis de la obesidad [20, 21]. Estudios clínicos demostraron que el consumo de una dieta alta en ácidos grasos saturados durante 3 semanas, produce una importante disfunción endotelial dependiente del óxido nítrico [22], estudios adicionales han demostrado que dietas altas en grasas produce inhibición del metabolismo del óxido nítrico [23] resaltando la importancia de la pérdida de óxido nítrico y el factor de que la obesidad sea considerada como un factor de alto riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular [24].

Este modelo de obesidad en ratones nos permite demostrar que en condiciones de pérdida natural del metabolismo del óxido nítrico esto pueda estar asociado con un mayor desarrollo de la enfermedad renal. Efectivamente en un modelo de obesidad en ratones sometidos a una dieta alta en grasas durante 8 semanas, hemos demostrado que se presentan ambas condiciones previamente descritas en trabajos con ratones deficientes en sintasa de óxido nítrico: aumento de los radicales libres de oxígeno y disminución del óxido nítrico (Figura 3).

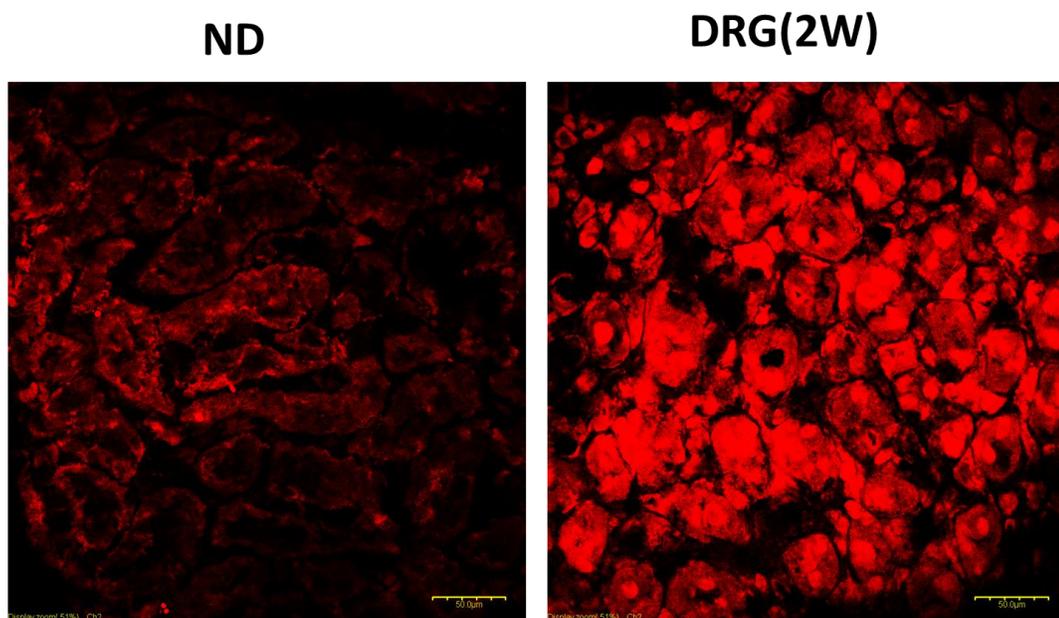


Figura 3. Generación de radicales libres muestras renales de animales con una dieta normal (ND) control y animales con una dieta rica en grasas (DRG) durante 2 semanas. La fluorescencia roja demuestra la detección del radical superóxido.

En dichas condiciones el desarrollo de insuficiencia renal se presenta de manera muy similar a lo demostrado en animales deficientes de sintasa de óxido nítrico, resultados esperados dado el profundo daño en la generación de radicales libres y de óxido nítrico. Por tal motivo hemos realizado experimentos en los cuales los animales son sometidos a dieta rica en grasas por 2 semanas y evaluamos el efecto en la generación de radicales libres y en el metabolismo de óxido nítrico. Esta dieta al final de las dos semanas produce sobrepeso de los

animales pero no genera cambios importantes en la presión arterial, glicemia o función renal. Sin embargo se generan cambios en la producción de radicales libres y alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico que se reflejan en la generación de dihidrobiopterina y pérdida de tetrahidrobiopterina (Figura 4).

Si estos animales son sometidos al desarrollo de insuficiencia renal, se puede apreciar que el aumento en la excreción urinaria de proteínas y la reducción de tetrahidrobiopterina producido por la insuficiencia renal es mayor en los animales obesos, comparados con animales normales.

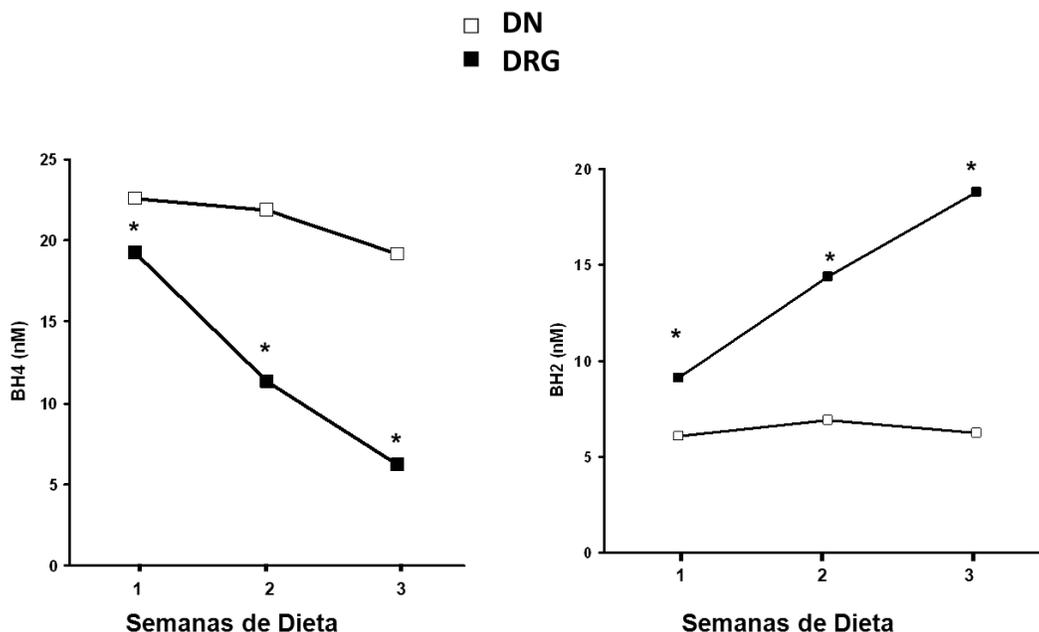


Figura 4. Producción de dihidrobiopterina (BH2) o tetrahidrobiopterina (BH4) en animales con una dieta normal (DN) o una dieta rica en grasa (DRG) durante dos semanas.

Estos datos no han permitido sugerir que el sobrepeso o un estado temprano de obesidad faciliten o potencien el desarrollo de las alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico y consecuentemente, el proceso de desarrollo de la insuficiencia renal se ve agravado en animales obesos.

En la mayoría de los estudios publicados la obesidad en animales experimentales se estudia después de un periodo prolongado de dieta y cuando el fenómeno de obesidad está claramente establecido [25]. Sin embargo en dichos modelos el daño cardiovascular y metabólico es claramente evidente, lo cual hace natural que cualquier enfermedad con génesis vascular sea potenciada. Es por eso que el modelo de sobrepeso o etapa inicial de obesidad propuesto por nosotros, representa una buena oportunidad para entender la importancia de la relación de radicales libres de oxígeno/óxido nítrico en los mecanismos de la enfermedad renal.

En este trabajo mostramos que ratones que han estado 2 semanas con una dieta alta en grasas y desarrollan sobrepeso sin cambios claros en glucosa, triglicéridos, presión arterial o función renal, demuestran que no se ha establecido un claro síndrome metabólico. Sin embargo demostró un cambio importante en el metabolismo del óxido nítrico ya que el cofactor, tetrahidrobiopterina, está reducido en estos animales obesos. Esta relación entre obesidad y óxido nítrico ha sido previamente reportada, como un aumento en la nitración en los animales obesos [26] y un aumento en el estrés oxidativo renal [27].

En el riñón, el óxido nítrico juega un papel muy importante en la hemodinámica renal y la reabsorción de agua y iones en la nefrona [28]. Nuestros datos muestran que los cambios en el metabolismo del óxido nítrico en animales obesos no son los suficientemente importantes como para que impacten la función renal a nivel macroscópico. Sin embargo la pérdida del cofactor tetrahidrobiopterina es fundamental para mantener acoplada a la enzima sintasa de óxido nítrico y consecuentemente mantener una producción adecuada de óxido nítrico. Pérdida de este acople con una disminución de óxido nítrico y aumento de radicales libres han sido mecanismos asociados al desarrollo de hipertensión arterial [29]. Es posible que el daño temprano del metabolismo del

óxido nítrico represente un mecanismo molecular sin un cambio en la función macroscópica.

La disminución de la tetrahydrobiopterina puede ser explicada por varios mecanismos. El aumento de leptina ha sido asociada con un aumento en la expresión de la sintasa del óxido nítrico y la disminución intracelular de L-arginina y tetrahydrobiopterina, dando como resultado un desacople de la sintasa de óxido nítrico y consecuentemente disminución del mismo [30]. De tal manera que la reducción de la tetrahydrobiopterina representa un cambio inicial de la obesidad. La presencia de radicales libres de oxígeno generados en la etapa inicial de la obesidad pueden ser muy importantes en la reducción de óxido nítrico. De tal manera que al presentarse un daño renal la reducción en la disponibilidad de óxido nítrico impide al tejido renal ajustar los cambios hemodinámicos para mantener la filtración glomerular adecuadamente dando como resultado el desarrollo prematuro de la insuficiencia renal.

Referencias

1. Modlinger P.S., Wilcox C.S. y Aslam S. (2004) *Sem. Nephrol.* **24**,354-365.
2. Vaziri N.D., Ni Z., Oveisi F., Liang K. y Pandian R. (2002) *Hypertension* **39**,135-141.
3. Gaertner SA., Janssen U. y Ostendorf T. (2002) *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**,2930-2937.
4. Hasdan G., Benchetrit S. y Rashid G. (2002) *Kidney Int.* **61**,586-590.
5. Paller M.S., Hoidal J.R. y Ferris T.F. (1984) *J. Clin. Invest.* **74**,1156-1164.
6. Chatterjee P.K., Cuzzocrea S. y Brown PA. (2000) *Kidney Int.* **58**,658-673.
- 7.- Fujii T., Takaoka M., Phkita Mç. y Matsumura Y. (2005) *Bio. Pharm. Bull.* **28**,641-645.
8. Clermont G., Lecour S. y Laher J. (2000) *Cardiovasc. Res.* **47**,618-623.
9. Ikizler T.A., Morrow J.D. y Roberts L.J. (2003) *Clin nephrol* **58**,190-197.
10. Mimic-Oka J., Simic T. y Djukanovic L. (1999) *Clin. Nephrol.* **51**,233-241.
11. Noiri E., Peresleni T., Miller F. y Goligorsky MS. (1996) *J. Clin. Invest.* **97**,2377-2383.
12. Baylis C. (2006) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **62**,123-130.
13. Vallance P., Leone A. y Calver A. (1992) *Lancet* **339**,572-575.
14. Schmidt R.J. y Bayliss C. (2000) *Kidney Int.* **58**,1261-1266.

15. Arellano MG., Castillo Henkel C., Medina Santillan R., Jarillo Luna A., Vargas Robles H., Romo E., Rios A. y Escalante B. (2008) *Nephrology* **13**,218-227.
16. Podjarny E., Hasdan G. y Berheim J. (2004) *Nephrol. Dial. Transplan.* **19**,2223-2227.
17. McCord J.M. (1985) *N. Engl. J. Med.* **312**(3),159-163.
18. Arellano MG., Vargas-Robles H., Del Valle-Mondragon L., Rios A. y Escalante B (2011) *Renal Failure* **33**(1), 47-53.
19. Chander V., Chopra K. (2006) *Arch. Med. Res.* **37**,19-26.
20. Galili O., Versari D., Sattler K.J., Olson M.L., Mannheim D., McConnell J.P., Chade A.R., Lerman L.O. y Lerman A. (2007) *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **292**, H904-H911.
21. Steinberg H.O., Chaker H., Leaming R., Johnson A., Brechtel G. y Baron A.D. (1996) *J. Clin. Invest.* **97**(11), 2601–2610.
22. Keogh J.B., Grieger J.A., Noakes M. y Clifton P.M. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**,1274-1279.
23. Martins M.A., Catta-Preta M., Mandarim-de-Lacerda C.A., Aguila M.B., Brunini T.C. y Mendes-Ribeiro A.C. (2010) *Arch Biochem Biophys.* **499**, 56-61.
24. Sun F., Tao Q. y Zhan S. (2010) *Nephrology.* **15**, 84-92.
25. Gretz N., Waldherr R. y Strauch M. (1993) *Experimental and Genetic Rat Models of Chronic Renal Failure* Edited by Gretz, N, Strauch, M Basel, Karger. pp 1–28.
26. Dobrian A.D., Davies M.J., Schriver S.D., Lauterio T.J. y Prewitt R.L. (2001) *Hypertension.* **37**, 554-560.
27. Deji N., Kume S., Araki S., Soumura M., Sugimoto T., Isshiki K., Chin-Kanasaki M., Sakaguchi M., Koya D., Haneda M., Kashiwagi A. y Uzu T. (2009) *Am J Physiol Renal Physiol.* **296**, F118-F126.
28. Herrera M. y Garvin J.L. (2005) *Hypertension.* **45**, 1062-1067.
29. Landmesser U., Dikalov S., Price S.R., McCann L., Fukai, T., Holland S.M., Mitch W.E. y Harrison D.G. (2003) *J. Clin. Invest.* **111**, 1201–1209.
30. Korda M., Kubant R., Patton S. y Malinski T. (2008) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H1514-H1521.

Semblanza del Dr. Bruno Escalante Acosta



El Dr. Escalante nació el 10 de octubre de 1952, en Ciudad Juárez Chihuahua. En 1978 se graduó de Médico Cirujano y Partero en la facultad de Medicina de la UACH. Obtuvo los grados de Maestro en Ciencias (Farmacología 1983), y Doctor en Ciencias (Farmacología 1986) en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN en la Ciudad de México. Realizó su entrenamiento postdoctoral en el Pharmacology Department del New York Medical College, USA (1987-

1988). Desde 1994 hasta la fecha, funge como Investigador del CINVESTAV. Es miembro del SNI nivel 3.

Tiene 103 trabajos publicados en revistas especializadas, 20 de estas han sido el resultado de tesis doctorales, 13 capítulos de libros y es coautor de 2 libros de texto. Su labor científica ha sido reconocida con 2400 citas.

El Dr. Escalante pertenece a la Sociedad Mexicana de Cardiología, a la Asociación Nacional de Cardiólogos, a la Sociedades Mexicanas de Farmacología y Fisiología, a la Academia Mexicana de Ciencias y en los Estados Unidos al High Blood Pressure Council, y la Interamerican Hypertension Society. Ha sido miembro de diferentes comités de evaluación de proyectos, sistema nacional de investigadores, becas y programas de posgrado del CONACYT y comités de evaluación Académica en Universidades como: UANL, UAM, UNAM, Universidad de San Luis Potosí, Guadalajara, Aguascalientes y la Universidad de California en Estados Unidos.

El Dr. Escalante ha sido responsable de la dirección de 20 tesis de Doctorado, 18 de Maestría y 5 de Licenciatura.

Ha recibido diversos premios, entre los que destacan: YOUNG INVESTIGATOR AWARD otorgado por el COUNCIL HIGH BLOOD PRESSURE RESEARCH USA en Septiembre de 1990. Premio TINSLEY HARRISON otorgado por los editores de Ame. J. Medical Sciences, por el mejor artículo de cardiología publicado en 1994. Premio MERCK SHARP & DOHME YOUNG INVESTIGATOR AWARD (1997) otorgado por la Interamerican Hipertensión Society. Premio Arturo Rosenbluth otorgado por la Sociedad Mexicana de Cardiología en 1996. Premio Western Pharmacology Society en 1997. Western Pharmacology Award en 1998. Premio AMEFAR-MMATISS otorgado por la Asociación Mexicana de Farmacología AC en 1999. Premio AMEFAR otorgado por la Asociación Mexicana de Farmacología en 2000. Premio de la Revista Medicina Universitaria Otorgado por la Facultad de Medicina de la UANL en el 2001. Premio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en mayo del 2001. Premio GEN de Investigación otorgado por el Grupo de Estudios del Nacimiento, GEN A.C. en 2003.

A lo largo de su trayectoria profesional, ha ocupado los cargos de Coordinador Administrativo del Depto de Farmacología, coordinador Académico y Jefe del Depto de Biomedicina Molecular del CINVESTAV. En el año 2005 fue invitado para que formara parte del proyecto: Monterrey Ciudad del Conocimiento. La dirección general del CINVESTAV nombro al Dr. Escalante como responsable de la creación de la nueva Unidad CINVESTAV Monterrey de la cual es actualmente el director.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 225 – 240, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

NUEVOS MODULADORES PROPUESTOS PARA EL DESARROLLO CELULAR EN LOS OVARIOS DE LOS MAMÍFEROS

PROPOSED NEW MODULATOR TO CELL DEVELOPMENT IN THE OVARIES OF MAMMALS

Félix Luna^{1§}, Victorino Alatríste¹, Ericka Barrientos¹, Alberto Molina¹, Maricela Torres-Soto¹, Carlos Escamilla-Weimann², Irma Herrera-Camacho³, Daniel Limón¹, Ma. Isabel Martínez¹ y Oscar González-Flores⁴

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP, Puebla CP72570, México, ²Bioterio "Claude Bernard" BUAP, Puebla CP72570, México, ³Centro de Química, Instituto de Ciencias, Puebla CP72570, México, ⁴Centro de Investigación en Reproducción Animal, UAT-CINVESTAV Tlaxcala, CP90140, México.

§ felix.lunam@hotmail.com

Resumen

El ensamble y desarrollo de los folículos del ovario se regula por factores internos y externos a la gónada, entre los que se encuentran las neurotrofinas que actúan a través de sus propios receptores. La liberación de las neurotrofinas depende del ion Ca^{2+} que proviene de canales iónicos como el receptor de potencial transitorio a vaniloideos tipo 1 (TRPV1). En la cobaya, los receptores TRPV1 se localizan en las células tecales de los folículos y células intersticiales del ovario. Al nacimiento (0 días de edad), la expresión de los receptores TRPV1 es baja en los folículos sanos, y al llegar la pubertad su expresión

aumenta (36 días de edad). Además, en cobayas juveniles (20-28 días de edad) tratadas con capsaicina (10 μ M, sc) disminuyen los folículos sanos y aumentan los folículos atrésicos del ovario. Otra molécula que interviene en el desarrollo folicular es la proteína codificada por el gen Felix-ina (FXNA), la proteína FXNA se expresa en las células de la granulosa de los folículos sanos, y no en los folículos atrésicos del ovario de la rata. Con el silenciamiento de este gen hubo pérdida de los folículos primordiales, primarios y secundarios, además de pérdida de la organización estructural del ovario. Adicionalmente, en el ovario de la rata se transcribe el gen ARL6ip, la proteína que codifica este gen se reconoce como inhibidora de la apoptosis. El transcrito del gen ARL6ip está en el ovario de la rata desde la edad fetal 21 (F21), y su nivel aumenta durante la primera semana de vida postnatal. En síntesis, los receptores TRPV1 y los genes FXNA y ARL6ip han sido propuestos como nuevos reguladores del desarrollo folicular del ovario, por lo que en esta revisión describiremos las acciones de estos genes y proteínas en las células de los ovarios de la cobaya y la rata.

Palabras clave: Receptores TRPV1, FXNA, ARL6ip, ovario, cobaya, rata,

Abstract

The formation of ovarian follicles and their development are regulated by internal and external factors to the gonad. Among ovarian regulators, we found the neurotrophins that act through their receptors. The neurotrophins secretion are stimulated by Ca^{2+} provided through ion channels such as the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1). In the guinea pig, the TRPV1 receptors are expressed in theca cells of the follicles and interstitial cells of the ovary. At birth (0 days old), the expression of the TRPV1 receptors is slight in healthy follicles, however it is increased at puberty. Additionally, in juvenile guinea pigs (20-28 days old) treated with capsaicin (10 μ M. sc) there is a decrease in healthy follicles and an increase in atretic follicles of the ovary. In another case, in the rat ovary, another important regulator required for folliculogenesis and follicular development is the gene Felix-ina (FXNA). This gene encoded the FXNA protein that is expressed in granulosa cells of the healthy follicles, however is not expressed in atretic follicles. Furthermore, when FXNA gene was silenced, there was a loss of primordial, primary and secondary follicles, and structural disorganization was observed in the ovary. Additionally, rat ovary expresses mRNA of the ARL6ip gene, a gene that encoded a protein that mediates apoptosis. In the rat ovary, the ARL6ip gene is expressed at fetal age (F21) and the transcription increases along the first week of the postnatal age. In summary, the TRPV1 receptor, FXNA and ARL6ip genes have been proposed as new regulators of the follicular development. In this direction, we will review protein and genes actions in the ovarian cells of the guinea pig and rat.

Keywords: TRPV1 receptors, FXNA, ARL6ip, ovary, guinea pig, rat.

Introducción

En los ovarios de roedores como la rata y la cobaya, la formación y el desarrollo de los folículos se regulan por los factores neurotróficos y las hormonas que actúan durante la foliculogénesis, el desarrollo folicular y la ovulación [1,2]. La rata ha sido un modelo animal ampliamente utilizado en el estudio de la fisiología de la reproducción, esto debido a que presenta ciclos estrales cortos (4-5 días), también gestación corta (21 días) y camadas grandes (10-12 crías). Por otro lado, en el caso de la cobaya y en comparación con la rata, es importante señalar que los ciclos estrales son largos (16-18 días), gestación larga (70 días) y camadas pequeñas (3 crías) [3]. En la cobaya, estas características reproductivas son debido a su patrón lento en la secreción de hormonas, lo que la hace más cercana a los sistemas humanos, en comparación a otros modelos animales de roedores [4,5]. Desde el punto de vista de la reproducción, en la cobaya se ha estudiado la implantación y desarrollo del embrión, además de la angiogénesis y adipogénesis relacionados con la preñez [4,5].

En el ovario de los mamíferos, la foliculogénesis ocurre antes o inmediatamente después del nacimiento. En ella se forman los folículos primordiales, los cuales están constituidos por el ovocito y células pregranulosas planas que lo rodean [1,2]. Posteriormente, hay dos fases de crecimiento folicular, una inicial que depende del efecto de varias neurotrofinas; como el factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT-4/5) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Subsecuentemente se produce una fase que principalmente depende de la acción de las hormonas hipotálamicas e hipofisiarias; como son la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) [2,3,4]. A partir de los folículos primordiales se originan los folículos primarios que se encuentran formados por el ovocito y una capa de células cúbicas de la granulosa.

Posteriormente, cuando las células tecales rodean a la capa de células de la granulosa, los folículos primarios se diferencian en los folículos secundarios [1,2,6], los cuales se siguen desarrollando hasta que aparece el antro que contiene al líquido folicular. En estos folículos hay células tecales maduras y vasos sanguíneos entre ellas. El máximo desarrollo se alcanza en los folículos preovulatorios, de los cuales se libera el ovocito durante la ovulación. Otro fenómeno fisiológico que se produce en los ovarios es la atresia, en donde cerca del 99% de los folículos ováricos degeneran y desaparecen por esta vía [2,7].

Genes y proteínas mediadores del desarrollo folicular del ovario

Durante la foliculogénesis ovárica hay tres genes que tienen un papel clave en el fenotipo de las células germinales. Uno de ellos es el gen que codifica para la proteína morfogénica del hueso 4 (Bmp4), que se requiere para generar células germinales en los epiblastos primitivos [8], otro es el gen para el factor celular pluripotencial (SCF), necesario para la sobrevivencia de las células durante su migración hacia la cresta de la gónada [9], el tercero es el gen para el factor 4 MMTV relacionado con “wingless” (Wnt4), una proteína de acción local que se requiere para la sobrevivencia de los ovocitos en las gónadas recién formadas [10]. Un factor adicional necesario para formar los folículos primordiales es el factor de transcripción en la línea de células germinales alpha (Fig α) [11].

Después de la diferenciación de las células germinales y células pregranulosas, el crecimiento de los folículos primordiales es regulado por varios factores que se producen por las células de la granulosa o por los ovocitos. De los factores de las células de la granulosa que promueven el crecimiento de los folículos se incluye; al SCF, también conocido como ligando kit KL (Kitl) [12,13], al factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) [14], al factor inhibidor de leucemia (Lif) [15], NT-4/5 y BDNF [16,17], entre otros [18]. De los factores del ovocito implicados en el control y crecimiento de los folículos se incluye; al factor de crecimiento de diferenciación 9 (Gdf9) [18], al gen homeobox (Nobox) [19] y a los receptores TrkB, que son receptores a tirosina cinasa de alta afinidad para las

neurotrofinas NT-4/5 [16,18]. La identificación de estas moléculas ha servido para evidenciar la formación y desarrollo inicial de los folículos, dado que su crecimiento posterior es dependiente de la acción de las gonadotropinas hipofisarias. Es claro que, en el ovario se requiere tanto de genes para el desarrollo de las células germinales y las células somáticas, como de genes para mantener la estructura celular y las funciones de los ovarios.

Los receptores TRPV1 intervienen en el desarrollo folicular del ovario de la cobaya

Varios estudios indican que las fibras eferentes y aferentes del ovario provienen del nervio ovárico superior, plexo ovárico y nervio vago [20], de las cuales, la mayor proporción de las fibras aferentes tienen sus cuerpos neuronales en los ganglios de la raíz dorsal lumbar (DRG). Son fibras C y A δ que sintetizan y liberan NGF, sustancia P (SP) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) actuando a través de sus propios receptores (TrkA, NKr o CGRPr, respectivamente) [6].

Los receptores TRPV1 se localizan en las terminales nerviosas periféricas y en las terminales centrales aferentes de la médula espinal, en donde el NGF modula su expresión y transporte del retículo endoplásmico a la membrana plasmática de las células [21]. En las terminales nerviosas periféricas, los receptores TRPV1 transducen estímulos sensoriales físicos y químicos, y también promueven el crecimiento de los axones [22,23]. En células no neurales como las células de los folículos pilosos, células del páncreas y células de la uretra, los receptores TRPV1 modulan la proliferación de las células y el desarrollo de los mismos tejidos [24,25]. Los receptores TRPV1 se activan por temperatura mayor a 45°C [26], pH ácido de 5.4 el estiramiento y presión. Otros activadores son los ligandos endógenos como la bradicinina, histamina, interleucinas y neurocininas; o ligandos exógenos como la capsaicina, [27,28]. Al activarse los receptores TRPV1, se libera SP,

CGRP [29,30], péptido intestinal vasoactivo (VIP) y glutamato [31]. Por medio de las vías ascendentes nerviosas, estos mensajeros envían información al SNC [30,32].

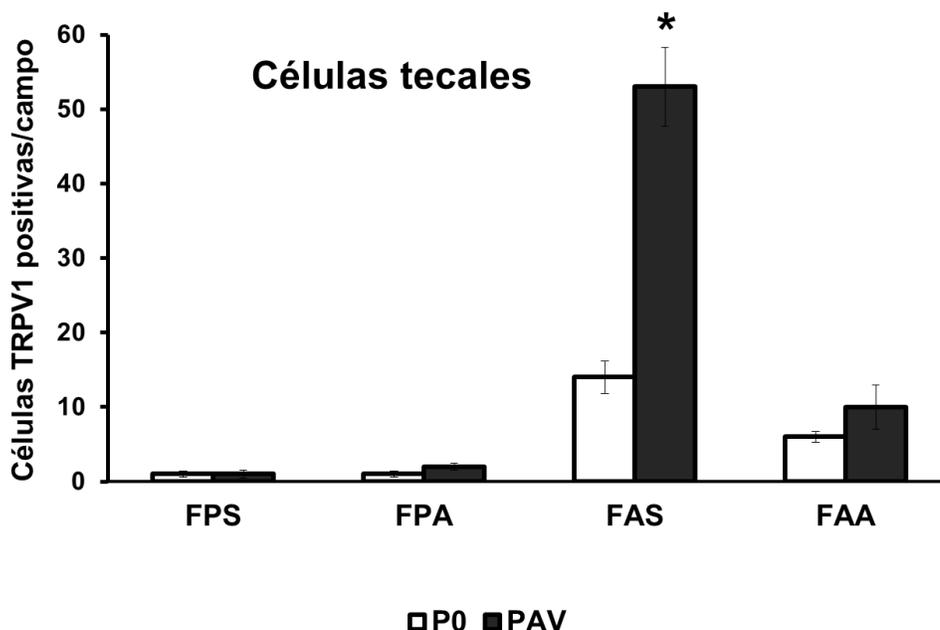


Figura 1. Células tecales TRPV1 positivas en los folículos ováricos de cobayas al nacimiento (P0) y a la primera apertura vaginal (PAV, 36 días). A. Folículos pre-antrales sanos (FPS), folículos pre-antrales atrésicos (FPA), folículos antrales sanos (FAS) y folículos antrales atrésicos (FAA) (n=4). *p<0.05, ANOVA seguida de U de Mann-Whitney.

En nuestro laboratorio y por medio de inmunohistoquímica, hemos evaluado la expresión de los receptores TRPV1 en las células del ovario de la cobaya al nacimiento (0 días de edad) y a la primera apertura vaginal (PAV, 36 días de edad). Los receptores TRPV1 se localizan en las células tecales y las células intersticiales del ovario (figura 1). Al nacimiento y a la edad de la PAV, en las células tecales de los folículos preantrales sanos (FPS), folículos preantrales atrésicos (FPA) y folículos antrales atrésicos (FAA) la expresión de los receptores TRPV1 es baja (figura 1), mientras que a la edad de la PAV, en los folículos antrales sanos (FAS), la expresión de los receptores TRPV1 aumenta (figura 1). En las células intersticiales, el nivel de expresión de los mismos receptores permanece bajo

a las dos edades estudiadas. En las cobayas al nacimiento, la baja expresión de los receptores TRPV1 en las células tecales, coincide con baja expresión de los mismos receptores en las neuronas del DRG de las ratas recién nacidas, aumentando su expresión en las ratas adultas [33].

En otra serie de experimentos y con idea de explorar algunos aspectos fisiológicos de los receptores TRPV1, hemos utilizado como herramienta farmacológica a la capsaicina. La capsaicina es un vaniloide que de forma natural se encuentra en los chiles, causa ardor, dolor e irritación de las mucosas [21,25]. De estudios ya reportados, sabemos que la capsaicina se ha utilizado como neurotóxico de las fibras aferentes C y A δ , para estudiar las funciones del receptor TRPV1 [34] dado que es un agonista específico de estos receptores [25]. Así, en cobayas juveniles (20-28 días de edad) evaluamos el desarrollo folicular en los ovarios a la edad de la PAV después de la administración subcutánea (sc) de capsaicina (10 μ M) en la región dorsal lumbar. Los cortes histológicos seriados de los ovarios teñidos con hematoxilina-eosina y analizados por microscopía óptica, indican que con la capsaicina, los FPS, FPA y FAS disminuyen (figura 2A), mientras que los FAA aumentan (figura 2A). Si clasificamos a los folículos sólo en las categorías de sanos y atrésicos, encontramos que con la capsaicina disminuyen los folículos sanos y aumentan los folículos atrésicos (figura 2B). Se ha reportado que la capsaicina a dosis altas, inicialmente provoca aumento en la corriente masiva de calcio y posteriormente la necrosis de las terminales nerviosas [22,35,36]. Aquí mostramos que al administrar capsaicina, el desarrollo folicular disminuye sensiblemente, resultado que se relaciona con la mayor expresión de los receptores TRPV1 en las células de la teca de los FAS presentados antes (figura 1).

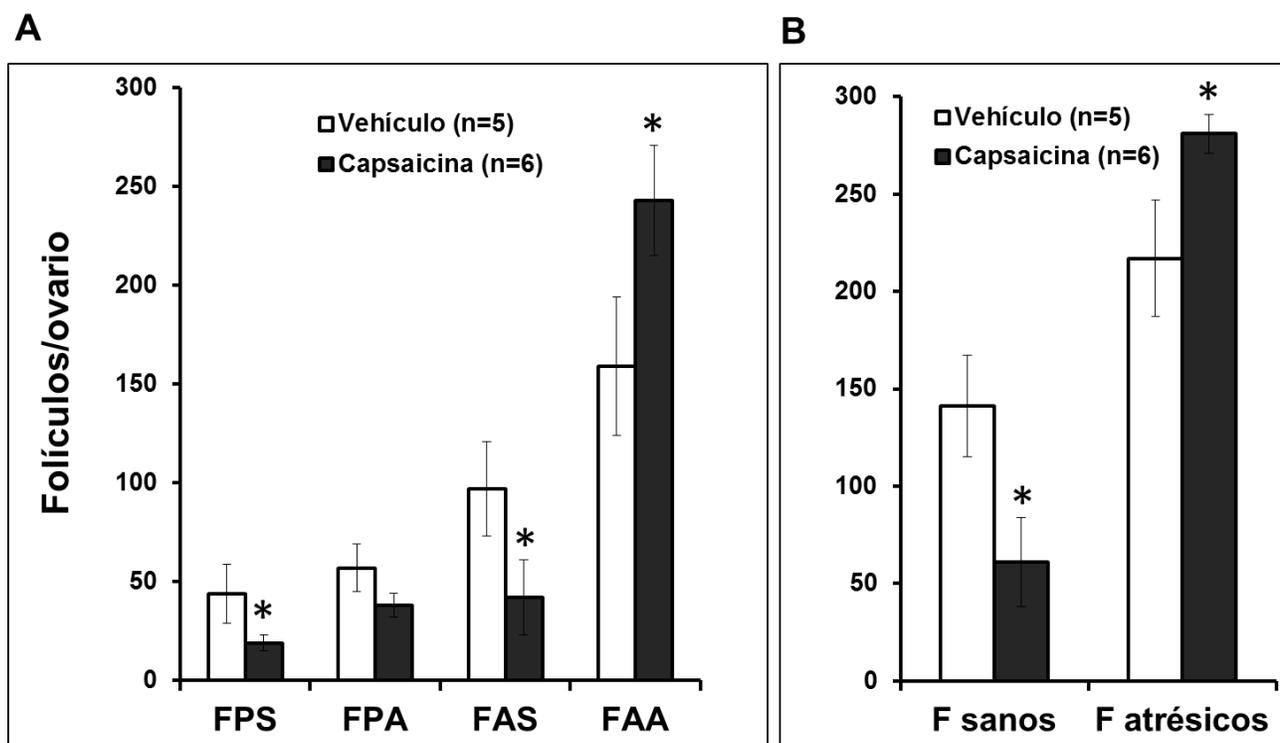


Figura 2. Poblaciones de folículos en los ovarios de las cobayas administradas con capsaicina (0.03 M) del día 20 al 28 de edad y autopsia a la edad de la primera apertura vaginal (PAV, 36 días). A. Folículos pre-antrales sanos (FPS), folículos pre-antrales atrésicos (FPA), folículos antrales sanos (FAS) y folículos antrales atrésicos (FAA) (n=4). B. Folículos sanos y folículos atrésicos. * $p < 0.05$, ANOVA seguida de U de Mann-Whitney.

El menor desarrollo de los folículos puede deberse al bloqueo de la corriente de Ca^{2+} de los receptores TRPV1 [21]. Es un fenómeno fisiológico regulado por los factores de crecimiento como el NGF. Previamente se ha reportado que en los ovarios de ratones, ratas y monos, el NGF a través del receptor TrkA interviene en la transición de los folículos primarios a folículos secundarios. Además, el NGF estimula la expresión de los receptores TRPV1 y la proliferación celular [37]. Esta evidencia experimental coincide con la menor cantidad de folículos que obtuvimos después de administrar capsaicina (figura 2), sustancia que también favorece la atresia de los folículos (figura 2B). Cabe señalar que

este resultado concuerda con la alta expresión de los receptores TRPV1 que hay en las células tecales de los folículos sanos en estado basal (figura 1).

Por otro lado, la capsaicina administrada en cobayas juveniles (20-28 días de edad), no modifica la edad de la PAV, la cual ocurrió a los 36 días de edad. En contraste, si la capsaicina (30 mM, sc) la administramos a cobayas infantiles (10 días de edad), la edad de la PAV ocurre hasta los 44 días. El atraso de la PAV de los animales coincide con el menor desarrollo de los folículos del ovario. Se ha reportado que las células tecales y células intersticiales también promueven la esteroidogénesis y la angiogénesis [13,25]. Además, si la población de los folículos sanos disminuye, también disminuye la producción de estradiol y progesterona. Se ha reportado que la capsaicina bloquea la transmisión aferente y consecuente disminuye la liberación de SP, CGRP y glutamato. Los péptidos SP y CGRP regulan el flujo sanguíneo, mientras que el glutamato impide la secreción de las gonadotropinas que regulan la pubertad [37,38]. Por otro lado, en ratones tratados con capsaicina disminuye el número de receptores TRPV1 en las neuronas del DRG, la concentración de SP, CGRP, glutamato y el umbral al dolor [38,39]. Un menor número de células TRPV1 positivas en los folículos de los ovarios de las cobayas tratadas con capsaicina puede resultar del menor transporte de los receptores TRPV1, fenómeno modulado por el NGF-TrkA y la proteína PKC. La modulación de los receptores TRPV1 por el NGF es pertinente, dado que después del traumatismo de las fibras nerviosas sensoriales, el NGF regenera las fibras afectadas, y la función sensorial se restablece [40].

Una explicación alterna para explicar el menor número de folículos que obtuvimos al administrar capsaicina, es que la proliferación celular mediada por los receptores TRPV1 no ocurra [17]. Se sabe que los TRPV1 modulan la proliferación de los sebocitos y osteoblastos [41,42]. También, en pollos que han ingerido alimentos picantes, aumenta el desarrollo de los folículos ováricos [43]. Evidencias adicionales en humanos, en donde la compresión de la médula espinal que daña a los nervios lumbares, provoca hiperactividad

del músculo detrusor de la vejiga urinaria e induce incontinencia. En estos individuos traumatizados, la expresión de los receptores TRPV1 aumenta en las células del músculo detrusor y en las células epiteliales de la uretra [48]. La hiperactividad del músculo dañado disminuye con la administración intravesical de capsaicina [44,45,46], una regulación que depende de la interacción del NGF con el receptor TRPV1 [46]. El NGF es un fuerte inductor de la sensibilización del receptor TRPV1, sin embargo, otras moléculas como la anandamida, los cannabinoides, leucotrienos e icosanoides, también sensibilizan a los mismos receptores [47,48]. Estos ligandos activan la corriente de Ca^{2+} y las proteínas intracelulares calcio calmodulina cinasa II, la proteína cinasa C y A que median la proliferación celular por medio del factor NF- κ B. Otra posibilidad es que la proteína p38 directamente active la transcripción de genes y la proliferación de las células [47,48]. Ambas vías de regulación estimulan el crecimiento celular y desarrollo de los tejidos periféricos. Finalmente, al bloquear la vía sensorial con capsaicina eliminamos las señales sensoriales aferentes hacia la médula, y por consecuencia afectamos la vía ascendente hacia el hipotálamo [49], una vía que debemos explorar posteriormente.

El gen FXNA interviene en la foliculogénesis normal del ovario de la rata

En el año 2007, publicamos la existencia, la localización genómica y celular de un nuevo gen en las células del ovario de la rata al que llamamos Felix-ina (FXNA) [50]. El gen FXNA se transcribe en las células de la granulosa de los folículos del ovario desde la edad fetal 21 y su nivel de transcripción aumenta durante la primera semana permaneciendo bajo en los animales adultos. El ARN mensajero es abundante en las células somáticas de los folículos primordiales y en las células de la granulosa de los folículos en desarrollo, incluyendo a los folículos pre-ovulatorios. El ARN mensajero de FXNA no se encuentra en las células de los folículos atrésicos, lo que sugiere que el estado funcional de los folículos está asociado a la pérdida de las funciones de FXNA, también indica que está relacionado con la transición de folículos sanos a folículos atrésicos [50].

La proteína FXNA es una metalopeptidasa de la familia M28 [51,52] con 9 dominios transmembranales (9DT) localizada en la membrana del retículo endoplásmico, de ahí la otra denominación con la que se conoce al gen FXNA (ERMP1). Dado que FXNA tiene 9DT, estructuralmente la hace similar a la proteasa de dos sitios activos (S2P), una metalopeptidasa que interviene en la proteólisis al unirse a ella los elementos reguladores de esterol (SREBPs) [53,54]. Las peptidasas que se localizan en las membranas intracelulares tienen importantes propiedades funcionales para las células. Una de ellas es la aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP), abundante en las membranas intracelulares, activa en estado basal y se redistribuye como respuesta al estímulo por insulina [55]. En la diabetes tipo 2, la acción de la insulina se interrumpe y también la translocación de IRAP, lo que sugiere que el procesamiento de péptidos mediados por IRAP en las membranas de las células son un componente intrínseco de la patología.

Con base en nuestros experimentos hemos sugerido que FXNA es una proteína esencial en la foliculogénesis normal, ya que cuando silenciamos al gen FXNA se interrumpe el ensamble y el crecimiento de los folículos del ovario, y la organización de las células somáticas en los folículos primordiales se pierde [50]. Además, las células pregranulosas aparecen en círculos con más de un ovocito, o también muchos ovocitos permanecen juntos sin adhesión a las células somáticas. A la fecha no se conocen los sustratos de FXNA, sin embargo, debido a su localización podemos especular que, FXNA puede ser necesaria para procesar proteínas involucradas en la señalización celular o en el control de la transcripción de genes. Otra posibilidad es la de ser una proteasa de degradación de precursores de la membrana. Por lo tanto, las alteraciones que se producen sobre la organización estructural por la pérdida de FXNA en el ovario, sugieren que los sistemas afectados están relacionados con las vías de comunicación intercelular que se requieren para la histogénesis normal. En el ovario, existen dos sistemas de señalización que pudieran afectarse por la deficiencia de FXNA, uno de ellos es Jagged-Notch [56,57] y el otro es el Wnt-Frizzled [58]. Tanto los receptores Notch2 como Frizzled se expresan en las

células de la granulosa a lo largo del desarrollo folicular [57,58]. En ambos casos, la pérdida de sus funciones resulta en anomalías parecidas a las encontradas por la deficiencia de FXNA. Hemos sugerido que FXNA procesa proteínas de señalización intracelular, como un evento que precede al transporte de proteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi.

Presencia del transcrito del gen ARL6ip en el ovario de la rata

Durante la embriogénesis y la organogénesis normal, el número de células en los tejidos y su morfología cambia, fenómeno que también ocurre en condiciones patológicas como el cáncer. En estos procesos, los cambios morfológicos son resultado de la expresión de diversos genes que codifican tanto proteínas de la membrana citoplasmática como proteínas intracelulares [59,60]. Una de las proteínas intracelulares relacionadas con la embriogénesis y la organogénesis es la proteína ARL6ip. Se trata de una proteína que se ha localizado en el retículo endoplásmico y reconocido como inhibidora de la apoptosis. También se ha reportado que cuando las células mueren por apoptosis, el nivel del ARN mensajero y el nivel de la proteína ARL6ip disminuyen, pero si hay proteína ARL6ip exógena, la apoptosis se inhibe [59].

Nuestro grupo de investigación ha identificado y secuenciado el gen ARL6ip de la rata [61]. Además ha evaluado la presencia del transcrito por RT-PCR en los ovarios desde la edad fetal 21 hasta los 6 días postnatales. A la edad fetal 21, el nivel del transcrito es bajo y durante la primera semana de vida postnatal (6 días) aumenta. Se trata de un intervalo del desarrollo de las ratas en el que ocurre la foliculogénesis del ovario y los primeros estadios del desarrollo de los folículos, también es un periodo del desarrollo en donde se determinará la población de folículos que se desarrollarán durante toda la etapa de reproducción de los animales. Con base en nuestros hallazgos y a los ya reportados en la literatura, podemos proponer que en el ovario de las ratas, la proteína ARL6ip participe en la foliculogénesis y en el desarrollo folicular inhibiendo la apoptosis.

Cabe señalar que la pérdida de células específicas por apoptosis permite la organización estructural y funcional de los órganos [62,63]. En los individuos sanos, hay un balance entre la actividad de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) y las proteínas activadoras de la apoptosis (caspasas) [64,65,66]. Por lo que cuando este sistema no se regula correctamente aparecen malformaciones estructurales, cáncer o resistencia a los fármacos [67,68,69]. Dado que en los ovarios de las ratas, el ARNm del gen ARL6ip aumenta durante los primeros días postnatales cuando también ocurre la foliculogénesis, es pertinente hacer experimentos para localizar la proteína en las células del ovario y estudiar su función.

Comentario final

Hay muchos estudios que tratan sobre la acción de los factores neurotróficos y sus receptores en el desarrollo folicular del ovario, sin embargo no se ha abordado el problema acerca de las moléculas con las que se relacionan, o sobre otras que intervienen en el mismo proceso celular. Aquí describimos que los receptores TRPV1 estimulan el desarrollo de los folículos sanos del ovario, además de la atresia que se induce. También damos evidencia de la participación de FXNA en la foliculogénesis normal, así como de la expresión del gen ARL6ip en el ovario. En conjunto se trata de nuevas moléculas propuestas como moduladoras del desarrollo folicular del ovario.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado con fondos del proyecto Luna F, VIEP-2012.

Referencias

1. Rajkovic, A., Pangas, A. S. y Matzuk, M. M. (2006) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Chapter 10, Third Edition, edited by Jimmy D. Neill, Elsevier

2. Ojeda, S. R. y Terasawa, E. (2002) *Hormones, Brain and Behavior*, Chapter 75, Volume IV, edited by Pfaff, D., Arnold, A., Etgen, A., Fahrbach, S., Moss, R. y Rubin, R. Elsevier
3. Alatríste, V., Paiz, B., Jiménez, M., Barrientos, E., Martínez, O., Torres-Soto, M., Martínez, M. I., Limón, I. D., Escamilla-Weinmann, C. y Luna, F. (2009) *Revista de Divulgación y Ciencia de los Animales de Laboratorio*. **4(1)**: 8-13
4. Lee, K.Y. y DeMayo, F. J. (2004) *Reproduction*, **128**, 679-695
5. Mitchell, B. F. y Taggart, M. J. (2009) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **297(3)**, R525-545
6. Dissen, G. A., Romero, C., Hirshfield, A. N. y Ojeda, S. R. (2001) *Endocrinology*.**142(5)**, 2078–2086
7. Dissen, G. A., Paredes, A., Romero, C., Dees, W. L. y Ojeda, S. R. (2004) *The ovary*, edited by Leung, P. y Adashi, E. Second Edition. Academic Press
8. Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P. y Hogan, B. L. (1999) *Genes Dev.* **13(4)**, 424-436
9. Godin, I., Deed, R., Cooke, J., Zsebo, K., Dexter, M. y Wylie, C. C. (1991) *Nature* **352(6338)**, 807-809
10. Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N. y McMahon, A. P. (1999) *Nature* **397(6718)**, 405-409
11. Liang, L., Soyol, S. M. y Dean, J. (1997) *Development* **124(24)**, 4939-4947
12. Huang, E. J., Manova, K., Packer, A. I., Sanchez, S., Bachvarova, R. F. y Besmer, P. (1993) *Dev. Biol.* **157(1)**, 100-109
13. Parrott, J. A. y Skinner, M. K. (1999) *Endocrinology* **140(9)**, 4262-4271
14. Nilsson, E., Parrott, J. A. y Skinner, M. K. (2001) *Mol Cell Endocrinol.* **175(1-2)**, 123-130
15. Nilsson, E. E., Kezele, P. y Skinner, M. K. (2002) *Mol. Cell. Endocrinol.* **188(1-2)**, 65-73
16. Paredes, A., Romero, C., Dissen, G. A., DeChiara, T. M., Reichardt, L., Cornea, A., Ojeda, S. R. y Xu, B. (2004) *Dev. Biol.* **267(2)**, 430-449
17. Skinner, M. K. (2005) *Hum. Reprod. Update* **11(5)**, 461-471
18. Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N. y Matzuk, M. M. (1996) *Nature* **383(6600)**, 531-535
19. Suzumori, N., Yan, C., Matzuk, M. M. y Rajkovic, A. (2002) *Mech. Dev.* **111(1-2)**, 137-141
20. Gerendai, I., Banczerowski, P. y Hala'sz, B. (2005) *Endocrine* **28(3)**, 309–318.
21. Messeguer, A., Planells-Cases, R. y Ferrer-Montiel, A. (2006) *Curr Neuropharmacol.* **4(1)**, 1-15
22. Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T. y Peters, A. J. (2007) *Physiol Rev.* **87(1)**, 165-217
23. Tominaga, M. y Tominaga, T. (2005) *Pflugers Arch.* **451(1)**, 143-150
24. Zhang, X., Huang, J. y McNaughton, A. P. (2005) *EMBO J.* **24(24)**, 4211-4223
25. Szallasi, A. y Blumberg, P. M. (1999) *Pharmacol Rev.* **51(2)**, 159-212
26. Ross, A. R. (2003) *Br J Pharmacol.* **140(5)**, 790-801
27. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. y Julius, D. (1997) *Nature.* **389(6653)**, 816-824

28. Ahern, G. P., Brooks, I. M., Miyares, R. L. y Wang, X. B. (2005) *J Neurosci.* **25**(21), 5109-5116
29. Aita, M., Maeda, T., Takagi, R. y Seo, K. (2005) *Archive Hystology Cytology.* **68**(4), 311-320
30. Arulmani, U., Maassenvandenbrink, A., Villalón, C. M. y Saxena, P. R. (2004) *Eur J Pharmacol.* **500**(1-3), 315-30
31. Zhou, H. Y., Chen, S. R., Chen, H. y Pan, H. L. (2009) *J Neurochem.* **108**(1), 305-318
32. Moiseenkova-Bell, V. Y., Stanciu, L. A., Serysheva, I. I., Tobe, B. J. y Wensel, T. G. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(21), 7451-7455
33. Julio-Pieper, M., Lozada, P., Tapia, V., Vega, M., Miranda, C., Vantman, D., Ojeda, S. R. y Romero, C. (2009) *J Clin Endocrinol Metab.* **94**(8), 3065-3071
- [Giordano, A.](#), [Morrone, M.](#), [Carle, F.](#), [Gesuita, R.](#), [Marchesi, G.F.](#) y [Cinti, S.](#) (1998) *J Cell Sci.* **111** (Pt 17), 2587-2594
1. Donnerer, J., Liebman, I. y Schicho, R. (2005) *Pharmacology* **73**(2), 97-101
2. Bonnington, K. F. y McNaughton, A. P. (2003) *J Physiol.* **551**(Pt 2), 433-446
3. Julio-Pieper, M., Lozada, P., Tapia, V., Vega, M., Miranda, C., Vantman, D., Ojeda, S. R. y Romero, C. (2009) *J Clin Endocrinol Metab.* **94**(8), 3065-3071
4. Shadiack, A. M., Sun, Y. y Zigmond, R. (2001) *J Neurosci.* **21**(2), 363-371
5. Beirith, A., Santos, A. R. y Calixto, J. B. (2003) *Brain Res.* **969**(1-2), 110-116
6. Czaja, K., Burns, G. A., y Ritter, R. C. (2008) *Neuroscience.* **154**(2), 621-630
7. Tóth, B. I., Géczy, T., Griger, Z., Dózsa, A., Seltmann, H., Kovács, L., Nagy, L., Zouboulis, C. C., Paus, R. y Bíró, T. (2009) *J Invest Dermatol.* **129**(2), 329-239
8. Idris, A. I., Landao-Bassonga, E. y Ralston, S. H. (2010) *Bone.* **46**(4), 1089-1099
9. Ozer, A., Zik, B., Erdost, H. y Ozfiliz, N. (2006) *Turk J Vet Anim Sci.* **30**, 7-15
10. Giannantoni, A., Conte, A., Farfariello, V., Proietti, S., Vianello, A., Nardicchi, V., Santoni, G. y Amantini, C. (2012) *Pharmacol Res.* **S1043-6618**, 236-238
11. Apostolidis, A., Dasgupta, P. y Fowler, C. J. (2006) *Eur Urol.* **49**(4), 644-650
- [Apostolidis, A.](#), [Popat, R.](#), [Yiangou, Y.](#), [Cockayne, D.](#), [Ford, A. P.](#), [Davis, J. B.](#), [Dasgupta, P.](#), [Fowler, C. J.](#), [Anand, P.](#) (2005) *J Urol.* **174**(3):977-982
1. Frias, B., Charrua, A., Avelino, A., Michel, M. C., Cruz, F. y Cruz, C. D. (2012) *BJU Int.* **110**(Pt B), E422-E4228
2. Takahashi, N., Tetsuka, T., Uranishi, H. y Okamoto, T. (2002) *Eur J Biochem.* **269**(18), 4559-4565
3. Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogkoi, Z. y Halász, B. (2009) *Endocrine.* **36**(2), 179-188
4. Garcia-Rudaz, C., Luna, F., Tapia, V., Kerr, B., Colgin, L., Galimi, F., Dissen, G. A., Rawlings, N. D. y Ojeda, S. R. *Development.* **134**(5), 945-957
5. Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. (1995) *Meth. Enzymol.* **248**, 183-228
6. Hsueh, A. J. W., Billig, H. y Tsafiriri, A. (1994) *Endocr. Rev.* **15**(6), 707-724
7. Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S. y Goldstein, J. L. (1997) *Mol. Cell* **1**(1), 47-57
8. Keller, S. R. (2003) *Front. Biosci.* **8**, s410-s420

9. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. y Lake, R. J. (1999) *Science* **284**(5415), 770-776
10. Lai, E. C. (2004) *Development* **131**(5), 965-973
11. Cadigan, K. M. y Nusse, R. (1997) *Genes Dev.* **11**(24), 3286-3305
12. Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D. y Moon, R. T. (1999) *Oncogene* **18**(55), 7860-7872
13. Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K. H., Falender, A. E., Lo, Y. K. y Sharma, S. C. (2002) *Recent Prog. Horm. Res.* **57**, 195-220
14. Ingley, E., Williams, J. H., Walker, C. E., Tsai, S., Colley, S., Sayer, M. S., Tilbrook, P. A, Sarna, M, Beaumont J. G. y Klinken, S. P. (1999) *FEBS Lett.* **459**(1), 69-74
15. Luna, F., de la Chesnaye, E. y Ojeda, S.R. (2003) *EMBL/GenBank/DBJ*: AY316590.1
16. Raff, M. C. (1992) *Nature.* **356**, 397-399
17. Barry, M. A., Behnke, C. A. y Eastman, A. (1990) *Biochem. Pharmacol.* **40**, 2353–2362
18. Adrain, C. y Marin, S. J. (2001) *Trends Biochem. Sci.*, **26**(6), 390–397
19. Bratton, S. B. y Cohen, G. M. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**(6), 306–315
20. Hacki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rosse, T., Fellay, I. y Borner, C. (2000) *Oncogene.* **19**(19), 2286–2295
21. Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H-G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R. y Martin, S. J. (1999) *J. Cell Biol.* **144**(2), 281–292
22. Wang, J. y Lenardo, M. J. (2000) *J. Cell Sci.* **113**(Pt 5), 753–757
23. Deveraux, Q. L. y Reed, J. C. (1999) *Genes Dev.* **13**(3), 239–252

Semblanza de Dr. Félix Luna



Profesor-investigador titular de tiempo completo en la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Para su formación académica, estudió la licenciatura de QFB y la maestría en Ciencias Fisiológicas. Ha realizado estancias de investigación en el Oregon National Primate Research Center/Oregon Health Science University USA. Como aportaciones científicas relevantes, está el haber descubierto un gen que lleva su nombre y registrado en el GeneBank NCBI.

Además, a realizado varias publicaciones en revistas especializadas. En la docencia, se desempeña como profesor de Fisiología y Farmacología en las licenciaturas de QFB y Farmacia y profesor de bioquímica de los ácidos nucleicos en el posgrado en Ciencias Químicas (área de Bioquímica y Biología Molecular). Finalmente, en relación a la formación de recursos humanos, Félix dirige tesis de licenciatura y posgrado.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 241 – 260, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASAS DE *Entamoeba histolytica*

PHOSPHATASE TYROSINE PROTEIN OF *Entamoeba histolytica*

Ana Lilia Ramírez Tapia, Jorge Antonio Pérez Saldaña, Francisco Sierra López, Lidia Baylón Pacheco, Patricia Espiritu Gordillo, Margarita Guaderrama Diaz, José Luis Rosales Encina.

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508. Colonia San Pedro Zacatenco,
Delegación Gustavo A. Madero. México, D.F., C.P. 07360.

Resumen

La familia de las proteína tirosina fosfatasas (PTP) desempeña papeles importantes en el control de prácticamente todos los aspectos de los procesos celulares. Sin embargo, la asignación de la importancia funcional de las PTPasas en la fisiología celular sigue siendo un reto importante en la señalización celular. Las PTPasas se pueden dividir en las fosfatasas de especificidad dual y las

PTPasas clásicas, las cuales pueden contener de uno o dos dominios de fosfatasa. Por otro lado, se ha descrito que PTPasas de agentes infecciosos juegan un papel importante en los mecanismos de patogenicidad. Nuestro grupo está interesado en la caracterización de las PTPasas de *Entamoeba histolytica* y estudiar el papel que estas juegan en la fisiología del parásito y en los mecanismos de patogenicidad. El genoma de *Entamoeba histolytica*, agente causal de la amibiasis, contiene 42 genes que codifican para PTPasas, mientras que el genoma humano contiene 107 genes. En esta revisión describimos los avances en el estudio de las PTPasas amibianas EhPTPA, EhPTPB, EhPRL y EhPTPLMW.

Palabras clave: Proteína tirosina fosfatasa, *Entamoeba histolytica*, amibiasis.

Abstract

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) family plays important roles in controlling virtually all aspects of cellular processes. However, assigning functional significance of PTPs in cell physiology remains a major challenge in cell signaling. PTPs can be divided into dual specificity phosphatases and the classical PTPs, which can comprise of one or two phosphatase domains. It has been described that PTPases from infectious microorganismos play an important role in the mechanisms of pathogenicity. Our group is interested in the characterization of PTPases from *Entamoeba histolytica* and to study the role that these enzymes play in the normal physiology and pathogenic mechanisms of the parasite. The genome of *E. histolytica*, the causative agent of amoebiasis, contains 42 genes encoding PTPases, while the human genome contains 107 genes. In this review we describe the advances in the study of the amoebic PTPases EhPTPA, EhPTPB, EhPRL and EhPTPLMW.

Keywords: Protein tyrosine phosphatase, *Entamoeba histolytica*, amoebiasis.

Introducción

Entamoeba histolytica es un parásito protozoario entérico exclusivo de los humanos y agente causal la amibiasis la cual es una enfermedad del tracto

gastrointestinal; la OMS considera a la amibiasis como la tercera parasitosis causante de mortalidad mundial, después de la malaria y la esquistosomiasis, observándose mayor impacto en países en desarrollo [1,2].

Se estima que el 10% de la población mundial esta infectada, el 90% de estas personas son asintomáticas. Aproximadamente se presentan 50 millones de nuevos casos anuales que desarrollan amibiasis intestinal de los cuales 100,000 son fatales [3]. En México, la amibiasis es una de las 20 principales causas de enfermedad, colocándose anualmente en el lugar 5 o 6. Hasta el 2006 se reportó una incidencia de amibiasis de 1128.8 a 615.85/100,000 habitantes por año. Los índices de mortalidad en México debido a complicaciones severas de amibiasis han disminuido grandemente; sin embargo, los reportes recientes indican que 8.41% de la población mexicana tiene anticuerpos circulantes anti-amiba indicando la alta exposición de la población mexicana a este parásito [4].

En su ciclo de vida, *E. histolytica* alterna diferentes estadios, pero adopta dos formas importantes desde el punto de vista médico, la vegetativa y la invasora que morfológicamente corresponden a los quistes y a los trofozoitos (figura 1) respectivamente [5,6]. *E. histolytica* es un protista amitochondrial que carece morfológicamente de retículo endoplásmico rugoso y del aparato de Golgi [7].

La infección se adquiere mediante la ingesta de agua o alimentos contaminados con quistes de *E. histolytica*; estos desenquistan en el lumen del intestino delgado donde dan origen a la forma de trofozoito; estos migran al intestino grueso donde se adhieren a la mucosa del colon y a las células epiteliales, aquí se multiplican por fisión binaria. El enquistamiento de los trofozoitos ocurre en el lumen del colon, los cuales son excretados en las heces y de esta manera se cierra el ciclo de vida del parásito [5,8].

El órgano blanco primario colonizado por este parásito es la mucosa intestinal del colon, donde solo las cepas de especies de *Entamoeba* altamente invasivas pueden desplegar su poder invasivo para producir daño al tejido; a nivel

intestinal puede originar padecimientos como disentería amibiana, colitis ulcerativa y ameboma. La colitis amibiana se caracteriza por la ulceración e inflamación del colon, al inicio de la enfermedad los trofozoítos causan una moderada infiltración de neutrófilos alrededor de los capilares y dentro del epitelio; después la infiltración de los neutrófilos incrementa y los linfocitos y macrófagos pueden verse en la lamina propia progresando a ulceración de la mucosa con trofozoítos penetrando a la submucosa creando úlceras en forma de botella [9].

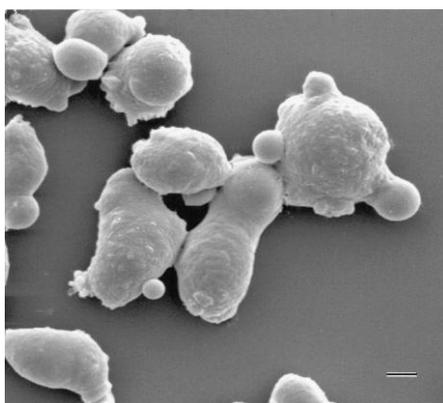


Figura 1. Microscopia electrónica de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* recuperados de absceso hepático. (Tomada de Chávez-Munguía B. *et. al* 2004, [6]).

Una vez invadida la mucosa intestinal, este parásito ocasionalmente puede migrar a otros órganos, tales como el hígado, pulmones o cerebro. La patología del desarrollo del absceso hepático amibiano (AHA) ha sido ampliamente estudiada. En las etapas iniciales del AHA los trofozoítos se diseminan por el torrente sanguíneo penetrando los sinusoides hepáticos, lugar en donde son rápidamente rodeados por neutrófilos formándose sitios de inflamación. Durante las etapas posteriores, los focos de inflamación adquieren una organización característica, presentando un región necrótica central compuesta por “debris” celular rodeada por dos capas periféricas, la primera de trofozoítos y la segunda de células del sistema inmune que separan la región de la infección del tejido hepático [10].

La patogenicidad o el efecto citopatogénico producido por los trofozoítos es multifactorial, se han propuesto factores propios de la amiba tales como: 1) Una

lectina de unión a galactosa que regula la unión de los trofozoitos a las células del hospedero que llega a inducir apoptosis celular, además, puede contribuir a la resistencia de la amiba al complemento, 2) amebaporos, estas son pequeñas proteínas formadoras de canales en la membrana de la célula huésped que permiten el paso de agua, iones y otras moléculas pequeñas provocando una variación osmótica que resulta en hinchazón y lisis celular y 3) una familia de cisteína proteinasas que participan en la invasión de tejidos por degradación de componentes de la matriz extracelular (MEC) tales como mucinas, fibronectina y colágena tipo IV; en la evasión de la respuesta del hospedero y en la inducción de la inflamación por proteólisis de quimiocinas e interleucinas importante [11,13].

La regulación de los procesos biológicos de *E. histolytica* como adhesión, secreción, migración y proliferación requieren de mecanismos de señalización al interior de la amiba que involucran la reorganización del citoesqueleto y la participación de proteínas involucradas en vías de señalización, estos eventos requieren la regulación coordinada de la fosforilación y defosforilación de proteínas en residuos serina, treonina y tirosina.

Proteína tirosina fosfatasas

La fosforilación de proteínas en tirosina es la principal modificación postraducciona usada por las células para regular la transducción de señales. Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) junto con las proteínas tirosina cinasas (PTKs) regulan la fosforilación reversible de residuos de tirosina en las proteínas sujetas a procesos de fosforilación, una desregulación del delicado balance entre la acción de PTKs y PTPasas se ha relacionado en el desarrollo de enfermedades humanas como autoinmunidad, diabetes y cáncer [14-16].

En un análisis *in silico* del genoma humano se identificaron 107 PTPasas, la clasificación se detalla en la figura 2. Definidas por su motivo C(X)5R, las PTPasas pueden ser divididas en dos categorías principales: las PTPasas clásicas específicas de tirosina que comparten el motivo "(I/V)HCSxGxGR(S/T)G" del sitio activo, donde x puede ser cualquier amino ácido, y las fosfatasas de

especificidad dual (DSPs), las cuales pueden llevar a cabo la defosforilación de residuos de tirosina, serina, treonina, y además defosforilan RNA y lípidos [17,18].

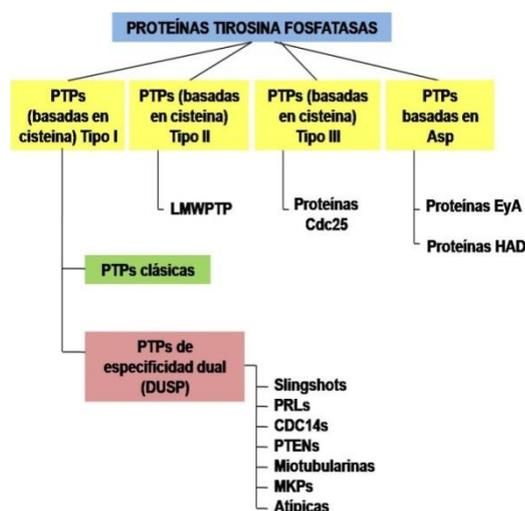


Figura 2. Clasificación de PTPasas. Estas se clasifican en 4 grupos dependiendo de la similitud del dominio catalítico. La familia más amplia es la de Tipo I que incluye las PTPs clásicas (defosforilan proteínas fosforiladas en Tyr) y las de especificidad dual (defosforilan proteínas fosforiladas tanto en Tyr, Ser o Thr). Las PTPs tipo II son PTPasas de bajo peso molecular cuyos sustratos son proteínas fosforiladas en Tyr. PTPs tipo III, tienen especificidad tanto para Tyr como para Thr y las PTPasas tipo IV, estas defosforilan PTyr y PSer. (Tomada de Patterson Kl. *et. al* 2009, [18])

El primer paso en el mecanismo catalítico de las PTPasas, es la formación de un intermediario enzima-fosfato (E-P) por el ataque nucleofílico de la cisteína (ubicada dentro del loop denominado loop-P) sobre el átomo de fósforo del sustrato, en este paso se da la liberación del sustrato defosforilado. Después de la formación E-P, un ácido aspártico conservado (ubicado dentro del denominado loop WPD) funciona como un ácido general para neutralizar cargas negativas sobre el intermediario. El segundo paso enzimático consiste en la hidrólisis del intermediario, esto se lleva a cabo por una molécula de agua que se activa por el ácido aspártico actuado como una base general, dando como resultado el restablecimiento de la enzima y la liberación de fosfato inorgánico. Experimentos mutando o modificando químicamente el residuo de cisteína del sitio activo, indican que este residuo es esencial para la actividad enzimática de las PTPasas,

lo que indica que todas las PTPasas emplean un mecanismo catalítico común [19].

El papel de las PTPasas en la patogenicidad se ha explorado para varios parásitos, bacterias y virus. Un ejemplo clásico es el que causa *Yersinia pestis*, el agente causal de la peste bubónica; esta inyecta YopH, una PTPasa altamente activa, dentro del citoplasma de células inmunes, la cual desfosforila proteínas claves en la señalización e inhibe la activación de células de respuesta inmune [20].

PTPasas en *E. histolytica*

E. histolytica tiene la habilidad de modificar los eventos de fosforilación en tirosina en células huésped por secreción o activación de PTPasas. Estudios han mostrado que la activación de PTPasas y desfosforilación de proteínas están asociadas con muerte celular [21]. Se ha estudiado la participación de una fosfatasa ácida de unión a membrana (MAP) de *E. histolytica* que presenta actividad de PTPasa y desfosforila específicamente O-fosfo-L-tirosina; se observó que la interacción de esta PTPasa con células HeLa afecta la integridad del citoesqueleto de actina, proponiendo que la presencia de actividad de PTPasa podría jugar un papel en la alteración de niveles de fosforilación de diferentes proteínas involucradas en transducción de señales, por lo tanto estas PTPasas podrías ser un elemento importante en el mecanismo patogénico [22].

Nuestro grupo de trabajo esta interesado en estudiar la función de las PTPasas en la biología del parásito y/o en los mecanismos de patogénesis. Para tal efecto, el análisis bioinformático del genoma de *E. histolytica* reveló la presencia de 42 genes que codifican PTPasas (Tabla I), de los cuales solamente 2 de ellos codifican para PTPasas clásicas.

TABLA I. PTPasas en los genomas de *Entamoeba histolytica* y de humano

Grupo	PTPasas	<i>E. histolytica</i>	Humano
Clásicas	RPTPasas	0	21
	NRPTPasas	2	17
Especificidad dual	MKPasas	11	11
	PTEN	8	5
	Slingshot	1	3
	Myotubularinas	11	16
	CDC14	NE	4
	PRLs	1	3
	DUSPasas atípicas	NE	19
	EyA	0	4
Cdc25	Cdc25	7	3
LMW	LMW	1	1
TOTAL		42	107

NE, No Encontrado

Es de llamar la atención el hecho de que en el genoma de *E. histolytica* solamente se encuentren 2 genes que codifiquen para PTPasas clásicas, y que estas sean del tipo no receptor, comparando con los 38 genes en el humano que codifican para las PTPasas clásicas, 21 para PTPasas tipo receptor (RPTPasas) y 17 para PTPasas tipo no receptor (NRPTPasas) (Tabla I).

EhPTPA y EhPTPB

Las proteínas recombinantes *rEhPTPA* y *rEhPTPB* obtenidas a partir de estos dos genes amibianos presentan su actividad máxima de fosfatasa ácida a un pH de 6.0 y 5.5 respectivamente con los siguientes parámetros cinéticos: *rEhPTPA* presenta una V_{max} de 0.0523 mmol/min y una K_m de 1.1 mM, y *rEhPTPB* presenta una V_{max} de 0.1428 mmol/min y una K_m de 10 mM. Los valores de V_{max} y K_m de las dos enzimas están dentro del rango de los parámetros cinéticos determinados para PTPasas clásicas de otros organismos. Debido a lo anterior, no se puede mencionar que estas PTPasas amibianas sean diferentes, cuando menos a nivel de los parámetros cinéticos mencionados, a otros miembros de la misma subfamilia de PTPasas.

Al analizar la expresión de los genes *EhPTPA* y *EhPTPB* a nivel de RNAm, se encontró que el gene *EhPTPA* se expresa en forma mas abundante en los trofozoitos recuperados de absceso hepático amibiano que en con los trofozoitos normales, mientras que el gene *EhPTPB* se expresa al mismo nivel en las dos condiciones (figura 3). El aumento en la expresión del gene *EhPTPA* sugiere que la enzima *EhPTPA* puede estar jugando un papel importante en la respuesta adaptativa o de estrés de los trofozoitos durante el desarrollo del absceso hepático amibiano.

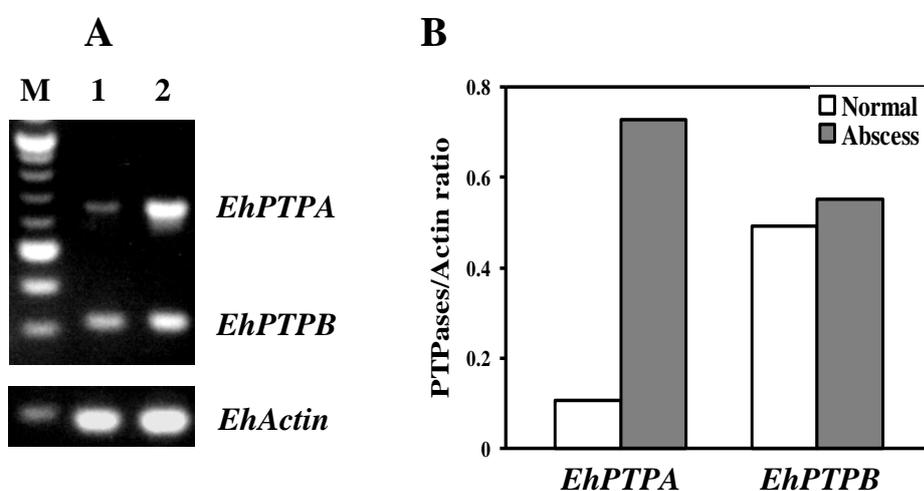


Figura 3. Expresión diferencial de los genes *EhPTPA* y *EhPTPB*. RNAm purificado de trofozoitos en fase logarítmica de crecimiento (1) y de trofozoitos recuperados de absceso hepático amibiano de 96 h de desarrollo (2), fue utilizado para ensayos de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Oligonucleótidos para actina se utilizaron como control. El cDNA obtenido se sometió a ensayos de PCR (A), y los productos de PCR obtenidos se analizaron densitométricamente (B). (Herrera-Rodríguez et al, 2006, [23])

Estudios de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos específicos, indican que estas se distribuyen uniformemente en membrana y citoplasma de trofozoitos de *E. histolytica*; sin embargo, la pregunta a contestar es, ¿cual la participación de estas proteínas en la regulación de los procesos biológicos de la amiba? Para abordar esta pregunta, se obtuvieron proteínas mutantes, principalmente en los aminoácidos esenciales que participan en el mecanismo catalítico de las PTPasas y que están conservados en las proteínas *EhPTPA* y *EhPTPB*. Las mutantes obtenidas fueron *EhPTPAD177A*,

EhPTPAQ294A, *EhPTPBD167A* y *EhPTPBC205S*, las cuales mostraron actividad enzimática disminuida del 100%, 90%, 80% y 100% respectivamente. Estos resultados sugieren que las proteínas mutantes que presentan 100% de inhibición de la actividad enzimática pueden ser utilizadas para atrapar los sustratos amibianos mediante columnas de afinidad. Utilizando extractos totales de trofozoitos y las proteínas recombinantes nativas o mutadas fusionadas a GST, se lograron identificar sustratos para la PTPasa *EhPTPB* (figura 4).

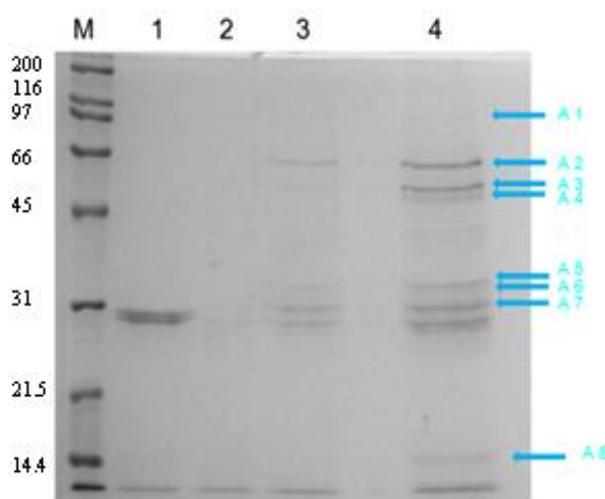


Figura 4. Análisis de sustratos para la proteína GST::EhPTPB. Extractos amibianos se pasaron por columnas de afinidad preparadas con las proteínas GST::EhPTPBs mutantes y nativa, y las proteínas unidas se analizaron por SDS-PAGE. Proteínas unidas a 1) GST, 2) GST::EhPTPB, 3) GST::EhPTPB D167A y 4) GST::EhPTPB C205S. M) Marcadores de peso molecular kDa. Se señalan las proteínas diferenciales, las cuales fueron sometidas a MS-MS.

Estos sustratos se encuentran involucrados en eventos como adhesión, señalización y en plegamiento y degradación de proteínas entre otros. Actualmente estamos identificando los sustratos para *EhPTPA* con lo que esperamos obtener información que nos permita entender mejor los mecanismos biológicos de relevancia llevados a cabo por *Entamoeba histolytica*.

EhPRL

Otra de las PTPasas de *E. histolytica* estudiada es la de especificidad dual PRL (fosfatasas de regeneración de hígado). Estas PRLs constituyen una nueva

clase de pequeñas PTPasas involucradas en la modulación del crecimiento celular. En humanos, esta familia incluye 3 miembros: PRL1, PRL2 y PRL3, desfosforilan específicamente residuos de tirosina. Las PRLs son fosfatasas activas que contienen en el extremo C-terminal un motivo de prenilación CAAX (característica exclusiva en esta familia de PTPasas) cuya función es la de ubicar a esta proteína en membranas celulares, una región polibásica requerida para la función bioquímica y el motivo catalítico C(X)₅R característico de todas las PTPs [24].

Las PRLs están involucradas en el control del ciclo celular; PRL-1 y PRL-3 puede regular la motilidad y la invasión a través de un efecto directo en el citoesqueleto de actina y a través de la regulación transcripcional de genes blancos. En años recientes se ha encontrado que estas PTPasas participan en procesos oncogénicos, ya que se ha observado que favorecen procesos tales como angiogénesis, invasión celular, motilidad y metástasis al transformar líneas celulares no tumorogénicas. Algunos de estos eventos han sido asociados con la estimulación de vías de señalización Src, Rho y PI3K [25,26].

Por tal motivo, con el interés de caracterizar y evaluar la participación de este tipo de fosfatasas en eventos como migración e invasión amibiana, en el laboratorio se ha clonado el gene PRL de *E. histolytica* (EhPRL), por análisis *In silico* se ha establecido que en el genoma de la amiba se localiza un solo gene para este tipo de PTPasa (Tabla I).

En la figura 5 se muestra la secuencia nucleotídica de este gene y los amino ácidos que codifica, dentro de los cuales se encuentra el sitio catalítico HCX₅R característico de las PTPasas donde se localizan los a.a. esenciales para la actividad enzimática - la cisteína y el residuo de arginina - denominado loop-P, además se señala el loop WPD con los a.a. que participan en la hidrólisis del sustrato. En la porción C-terminal se muestra el posible sitio de palmitoilación.

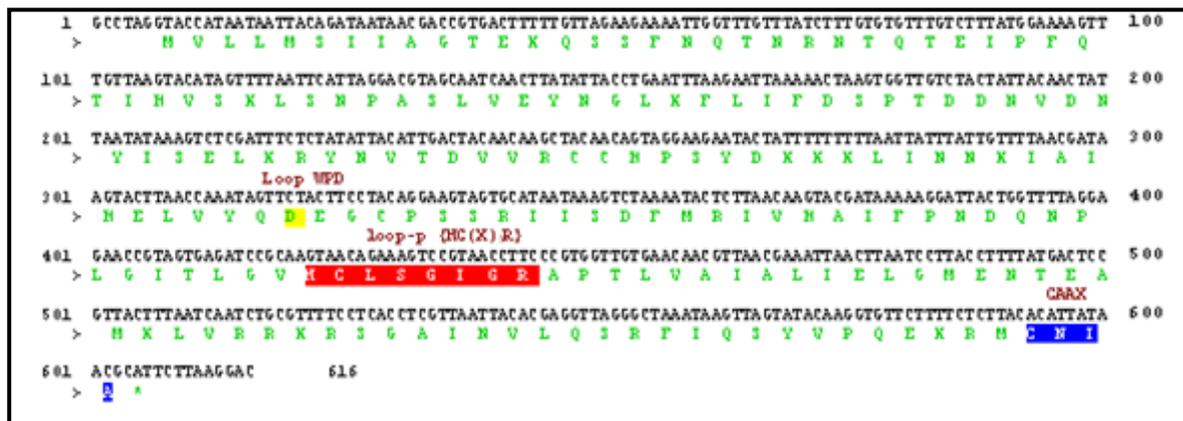


Figura 5. Secuencia de a.a. de la proteína EhPRL de *E. histolytica*. En el recuadro rojo se indica el sitio catalítico donde se localizan el residuo de Cys y Arg esenciales para la actividad enzimática. El recuadro amarillo representa el dominio WPD donde se ubica el residuo de Asp que estabiliza el complejo E-S, el recuadro azul indica el motivo de palmitoilación.

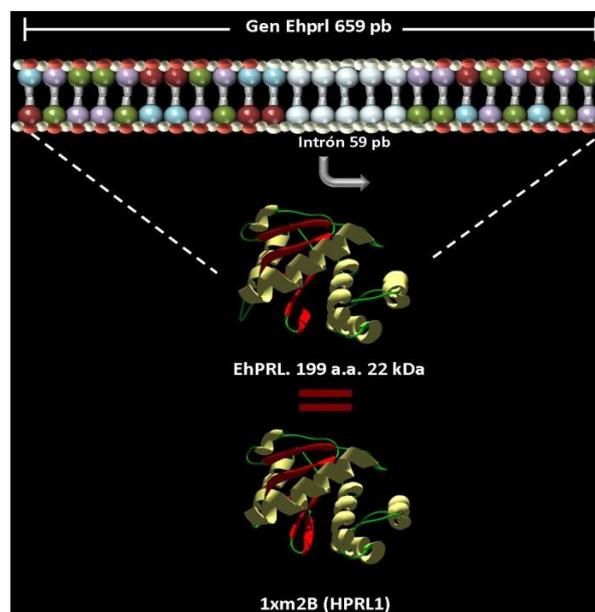


Figura 6. Gen y proteína EhPRL de *E. histolytica*. El gen EhPRL consiste de 659 pb, presenta un intron de 59 pb, el mRNA sintetiza una proteína de 199 a.a. con un peso molecular de 22 kDa. Se muestra la similitud estructural de EhPRL con la fosfatasa PRL1 de humano identificada como el código 1xm2B.

La proteína EhPRL presenta una homología de 34-36% con las PRLs de humanos, siendo más alta en el dominio catalítico. La homología mas alta la

presento con HuPRL1, lo cual permitió obtener su estructura 3D teórica (figura 6). Una diferencia importante a señalar es que las PRLs de humanos son preniladas/farnesiladas, mientras que la PRL amibiana presenta una alta predicción a ser palmitoilada.

La proteína EhPRL puede ser una enzima multifuncional, ya que por tener la amiba solo una PTPasa PRL, ésta pudiera estar regulando diversos procesos biológicos que en humanos o mamíferos superiores pudieran ser reguladas por los otros miembros de la subfamilia. Para iniciar el estudio de la posible función de *EhPRL*, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) ya que la localización subcelular de una proteína en particular en ocasiones puede dar indicios de la su posible función fisiológica. Para esto, se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-GST::*EhPRL* para la inmunolocalización de la proteína nativa (figura 7).

En trofozoitos no permeabilizados se observó una distribución homogénea sobre la membrana plasmática; en humanos se ha reportado el mismo patrón de localización y se ha establecido que esta es dependiente de la farnesilación [27]; como ya se mencionó, *EhPRL* presenta en su secuencia un posible motivo de palmitoilación que pudiera favorecer esta localización. En trofozoitos permeabilizados se observó una distribución particular; la proteína también se localizó en el citoplasma en algunos trofozoitos (figura 7B-2); en humanos, se ha propuesto que las PTPs PRLs no farnesiladas pueden localizarse en el citoplasma, ya que estas enzimas requieren de la modificación por parte de enzimas farnesil transferasas para que se relocalicen en membrana tanto plasmática como nuclear. Además, también se observó un grupo de trofozoitos donde la proteína se localizó en un polo de la misma; esto probablemente está asociado con la migración de la amiba, pues pudiera estar participando en la extensión de filopodios y/o pseudópodos necesarios para la migración.

Para analizar el papel de *EhPRL* en la migración de los trofozoitos, se clonó gen *EhPRL* fusionado a una etiqueta (HSV) en el vector de expresión

amibiano pNEO. La etiqueta fue colocada estratégicamente tanto en la región carboxilo terminal como en la región amino con el objetivo de evaluar la posible interferencia en la ubicación de la proteína exógena en la membrana. Con estas construcciones pNEO vacío, pNEO-HSV-EhPRL y pNEO-EhPRL-HSV, una vez corroboradas las construcciones por secuenciación, trofozoitos de *E. histolytica* fueron transfectados por electroporación y crecidos en presencia del antibiótico de resistencia G418, se realizaron curvas de crecimiento dosis respuesta. Con estos ensayos se pudo observar un incremento en el número de trofozoitos con la construcción pNEO-HSV-EhPRL después de 3 días de incubación con el antibiótico, sugiriendo la participación de la proteína en procesos de proliferación celular, efecto que no fue observado en el crecimiento de amibas transfectadas con el vector vacío o pNEO-EhPRL-HSV.

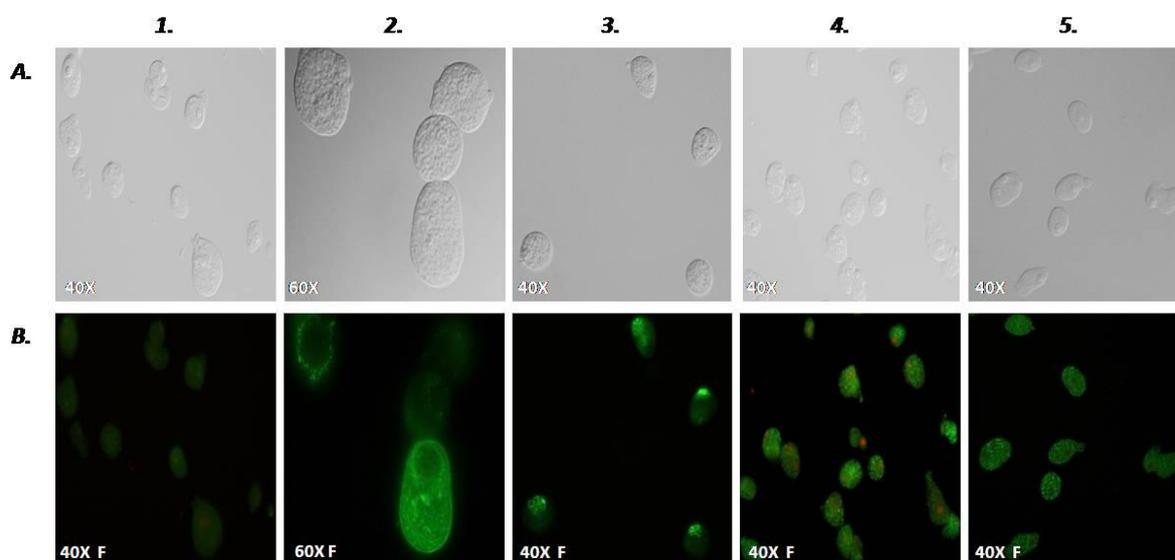


Figura 7. Localización celular de la proteína EhPRL en *E. histolytica* por IFI. En A1-5 se muestra un campo representativo con trofozoitos observados en contraste de fases (40X o 60X). En B1-5 se muestran las inmunofluorescencias (40X o 60X). En la columna 1 se muestra el reconocimiento del suero preinmune como control negativo; columnas 2 y 3 son trofozoitos permeabilizados y en 4 y 5 amibas no permeabilizados.

Para asegurarnos de la correcta sobreexpresión de las proteínas exógenas, se realizaron ensayos de RT-PCR a partir del RNA de cada clona de amibas. Usando oligonucleótidos específicos se pudo determinar que el RNA mensajero de ambas construcciones se sobreexpresaba al menos el doble que el

observado en las amibas control. Además, por western blott y utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HSV se evaluó el nivel de expresión de proteínas a partir de extractos totales de amibas transfectadas, en donde se observó claramente la sobreexpresión de la proteína exógena.

Los ensayos de migración se realizaron en transwell utilizando las 3 cepas de trofozoitos transfectados con pNEO vacío, pNEO-HSV-EhPRL y pNEO-EhPRL-HSV respectivamente. Estos ensayos se realizaron en presencia de suero adulto bovino o fibronectina como quimioattractantes, y el proceso de migración se evaluó después de 4 h de incubación a 37°C. El efecto en migración fue obtenido como índice de migración con respecto al control sin quimioattractante. Para obtener estos datos, el número de células que migraron fue determinado por fluorimetría a 480-535 nm ya que las amibas fueron teñidas con la sonda para células vivas CellTracker Green. Una vez realizados 3 ensayos independientes se pudo concluir que la proteína EhPRL (pNEO-HSV-EhPRL) sí está participando en la migración de los trofozoitos *E. histolytica* en respuesta a ambos quimioattractantes, siendo más significativa la migración en presencia de FN. Interesantemente, se observó que amibas con la construcción interferida por la etiqueta HSV en C-terminal no migraron en la misma proporción que las amibas con HSV en N-terminal; de esta manera pudimos establecer que HSV pudo haber impedido que la proteína fuera modificada post-traduccionalmente, modificación que le permite a la proteína ser insertada en la membrana.

Para corroborar lo observado por los ensayos de migración en Transwell se realizaron ensayos de "Cierre de herida" sobre placas de cultivo crecidas a confluencia. La herida se realizó con una punta blanca para pipeta, se colocó medio con 0.5% de SAB solo como medio para mantener la estabilidad de la células, esta concentración no induce proliferación o migración. Se monitoreó el cierre de la herida a los 15, 30, 60 y 120 min. Posteriormente, las placas fueron fijadas con p-formaldehído al 4% y teñidas con 10% de giemsa. Utilizando un microscopio invertido y una cámara Nikon adaptada se tomaron fotos representativas. Con este ensayo pudimos observar claramente que

efectivamente, las amibas transfectadas con pNEO-HSV-EhPRL cerraron la herida a las 2 h, fenómeno no observado en las amibas control (vector vacío) ni en las amibas transfectadas con pNEO-EhPRL-HSV.

Con el fin de evaluar la posible re-localización de la proteína “no funcional” o pNEO-EhPRL-HSV se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, usando el anticuerpo anti-HSV. También las otras dos clonas fueron analizadas. Como resultado se obtuvo una ausencia de fluorescencia en amibas transfectadas con el vector vacío pues este no contiene la etiqueta HSV; las amibas con la construcción en N-terminal mostraron una marca tanto en la membrana como en el citoplasma, comportamiento observado en amibas WT y con el anticuerpo policlonal anti-rEhPRL. Interesantemente, las amibas con la construcción en C-terminal mostraron una disminución considerable en el marcaje membranal aunque no se observó incremento en el reconocimiento en citoplasma, probablemente porque la proteína es degradada; además, se observó una ligera colocalización de la proteína en el núcleo. Además, se realizaron fraccionamientos membranales de las 3 clonas para corroborar lo observado anteriormente. Por lisis hipotónica se obtuvieron fracciones citoplasmáticas y de membranas totales, estas fueron cuantificadas y ajustadas para realizar ensayos de western blot, como control de carga se utilizó anti-actina. Con estos ensayos se pudo observar que toda la proteína en N-terminal fue dirigida a membranas pues no se observó reconocimiento del anticuerpo anti-HSV en fracción citoplásmica, este efecto no se observó en la construcción en C-terminal donde se pudo establecer claramente que esta proteína fue retenida en fracción citoplásmica.

Con el objetivo de evaluar en un modelo *in vivo* el posible efecto en la patogenicidad de los trofozoitos con una mayor capacidad migratoria, se indujeron (en el modelo de Hámster) abscesos hepáticos por inoculación directa de las amibas de las tres clonas en el lóbulo derecho del hígado; 7 días después los hámsteres fueron sacrificados y se extrajeron los hígados de cada grupo para evaluar el daño. De los primeros resultados se pudo observar que los hámsteres

del grupo C-terminal no desarrollaron absceso hepático, en comparación, los pertenecientes al grupo N-terminal desarrollaron abscesos 20% más grandes que los observados por el grupo control (vector vacío). Estos resultados y los obtenidos en experimentos de migración indican que la enzima EhPRL participa en los procesos de migración e invasión de los trofozoitos.

EhPTPLMW

Otra de las PTPasas de *E. histolytica* en estudio es la de bajo peso molecular (PTPLMW). Utilizando oligonucleótidos específicos en ensayos de PCR se clonaron los genes PTPLMWA y PTPLMWB a partir de DNA genómico. La secuenciación de los productos de PCR y su posterior comparación reveló que los genes comparten un 99.5% de identidad en su secuencia de nucleótidos. El gen PTPLMWA mostró la presencia de un sitio de restricción para la enzima BsrDI, el cual está ausente en el gen PTPLMWB. La presencia de este sitio de restricción se debe a la sustitución de un nucleótido lo que conlleva a la sustitución del amino ácido valina en PTPLMWB por el amino ácido alanina en PTPLMWA.

Ensayos enzimáticos con las proteínas recombinantes rHis6EhPTPLMWA y rHis6EhPTPLMWB mostraron que ambas enzimas tienen un pH óptimo de actividad de 6. Por otro lado, rHis6EhPTPLMWA mostró mayor actividad enzimática hacia el sustrato p-nitrofenol fosfato (5 veces) que rHis6EhPTPLMWB, con una K_m menor para rHis6EhPTPLMWA y con respecto a la observada para rHis6EhPTPLMWB. Análisis *in silico* mostraron que el aminoácido distintivo en la posición 85, que es una alanina en PTPLMWA y una valina en PTPLMWB, influye en diferencias ligeras en la estructura de las 4 cadenas beta plegadas y en la región cercana al sitio catalítico de las proteínas, pero que son contundentes para proporcionar “ K_m ” muy distintas, por lo que es probable que posean diferentes sustratos *in vivo*.

Ensayos de inmunotransferencia con anticuerpos anti-rHis6EhPTPLMWA mostraron que estos reconocen a ambas proteínas recombinantes y que reconocen una proteína de 21 kDa en extractos totales de trofozoitos de *E.*

histolytica. Utilizando estos anticuerpos se encontró, por ensayos de inmunofluorescencia, que la proteína nativa se distribuye en el citoplasma y en vacuolas del parásito. Por otro lado, ensayos de RT-PCR con RNA obtenido de trofozoitos en cultivo, recuperados de abscesos hepáticos amibianos y de la cepa *E. dispar* (no patógena para el ser humano) mostraron que los trofozoitos en cultivo expresan los dos genes, los recuperados de absceso hepático expresan solamente rHis6EhPTPLMWB y los de la cepa *E. dispar* expresan solamente rHis6EhPTPLMWA. Con el fin de corroborar estos resultados, se analizó el genoma de *E. dispar* encontrando que solamente tiene el gen rHis6EhPTPLMWA, mientras que el genoma de *E. histolytica* contiene ambos genes.

Con base en los resultados anteriores se puede mencionar que el gen EhPTPLMWB es un marcador específico de *E. histolytica* cuya expresión sugiere su participación en mecanismos de patogenicidad del parásito.

Agradecimientos

Damos las gracias a Azael Martínez de Luna y a Enrique Martínez de Luna por su ayuda técnica, y a María Guadalupe Aguilar González (Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav, México, DF) por la secuenciación del ADN.

ALRT, JAPS, FSL y MGD son beneficiarios de una beca por parte del CONACyT, México. Este trabajo fue apoyado por CONACyT, México (Grants 47437 y 104119) a JLRE.

Referencias

1. Pinilla, A.E., López, M.C., y Viasus, D.F. (2008) *Rev. Med. Ch.* **136**, 118-124.
2. García-Zepeda, E.A., Rojas-López, A., Esquivel-Velazquez, M. y Ostoa-Saloma, P. (2007) *Parasite Immunol.* **29**, 679-684.
3. Ravdin, J. I. (1995) *Clin. Infect. Dis.* **20**, 1453-1466.
4. Ximenez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A. y Gómez, A. (2009) *Gen. Evol.* **9**, 1023-1032.
5. Espinosa-Cantellano, M. y Martínez-Palomo, A. (2000) *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 318-331.
6. Chavez-Munguía, B., Hernández-Ramírez, V., Angel, A., Rios, A., Talamás-Rohana, P. y González-Robles, A. (2004) *Exp. Parasitol.* **107**, 39-46.

7. Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C., Samuelson, J., Amedeo, P., et al. (2005) *Nature* **433**, 865-868.
8. Lohia, A. (2003) *Mol. Cell. Biochem.* **253**, 217-222.
9. Prathap, K. y Gilman, R. (1970) *Am. J. Pathol.* **60**, 229-245.
10. Rigother, M., Khun, H., Tavares, P., Cardona, A., Huerre, M. y Guillén, N. (2002) *Infect. Immunol.* **70**, 3008-3215.
11. Leippe, M., Bruhn, H., Hecht, O. y Grotzinger, J. (2005) *Trends Parasitol.* **21**, 5-7.
12. Vines, R. R., Ramakrishnan, G., Roger, J. B., Lockhart, L.A., Mann, B.J. y Petri, W. A. (1998) *Mol Biol Cell.* **9**, 2069-2079.
13. Zhang, Z., Yan, L., Wang, L., Seydel, K. B., Li, E., Ankri, S., Mirelman, D. y Stanley S. L. (2000) *Mol. Microbiol.* **37**, 5442-5548.
14. Blume, P. y Hunter, T. (2001) *Nature* **411**, 355-365.
15. Denu, J., y Dixon, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 5910-5914.
16. Meza, I. (2000) *Parasit. Today* **16**, 23-28.
17. Andersen, J., Jansen, P., Echwald, S., Mortensen, O., Fukada, T., Vecchio, R., Tonks, N. y Møller, N. (2004) *The FASEB J.* **18**, 8-30.
18. Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M. y Daly, R.J. (2009) *Bioch. J.* **418**, 475-489.
19. Laiping, X., Zhang, Y.L. y Zhang, Z.Y. (2002) *J. Biochem.* **41**, 4032-4039.
20. Mustelin, T., Vang, T. y Bottini, N. (2005) *Nat. Rev.* **5**, 43-57.
21. Teixeira, J.E. y Mann, B.J. (2002) *Infect. Immun.* **70**, 1816-23.
22. Aguirre-García, M.M., Anaya-Ruiz, M. y Talamás-Rohana P. (2003) *Parasitology* **126**, 195-202.
23. Herrera-Rodríguez, S.E., Baylón-Pacheco, L., Talamás-Rohana, P. y Rosales-Encina, J.L. (2006) *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **342**, 1014-021.
24. Stephens, B.J., Han, H., Gokhale, V. y Von Hoff, D.D. (2005) *Mol. Cancer Ther.* **4**, 653-661.
25. Sun, J.P., Luo, Y., Yu, X., Wang, W.Q., Zhou, B., Liang, F., et al. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 29043-29051.
26. Liang, F., Liang, J., Wang, W.Q., Sun, J.P., Udho, E. y Zhang, Z.Y. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 5413-5419.
27. Zeng, Q., Si, X., Horstmann, H., Xu, Y., Hong, W. y Pallen, C.J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 21444-21452.

Semblanza del Dr. José Luis Rosales Encina



Es QFB egresado de escuela Escuela de Ciencias Químicas (1978) de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Curso estudios de Maestría en Biología Celular (1982) y de Doctorado en Bioquímica (1987) en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav-IPN).

De 1987 a 1990 ocupó una posición posdoctoral en el Departamento de Patología Experimental del Centro Médico de la Universidad de Nueva York. Ingresó al departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (antes Patología Experimental) del Cinvestav-IPN en 1990 donde actualmente es investigador Cinvestav 3D.

Sus líneas de investigación incluyen: Bioquímica, inmunología y biología molecular de *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*.

Es miembro de Sistema Nacional de Investigadores Nivel II. Es autor de 66 publicaciones en revistas especializadas con arbitraje, de capítulos en libros internacionales y de artículos de divulgación. Ha graduado 2 alumnos de posdoctorado, 18 de doctorado, 17 de maestría y 3 de licenciatura. Ha recibido el Premio Anual de Investigación Médica “Dr. Jorge Rosenkranz 1996”, el Premio Nacional de Investigación “Fundación Glaxo Wellcome” en los años 1993 (Investigación Básica), 1996 (Investigación Epidemiológica), 1997 (Investigación Básica) y 2010 (Investigación Básica), y el Premio “Maximiliano Ruiz Castañeda” sobre Investigación Básica 1999.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 261 – 274 15, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

ESTROGENOS DE USO CLINICO

CLINICAL USE ESTROGEN

Ruth Jaimez Melgoza

Laboratorio de Estrógenos y Hemostasia. Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina, Torre de Investigación sexto piso laboratorio 4.
Circuito interior, Ciudad Universitaria. 04510. México, D.F.
Email: jaimezruth@hotmail.com

Resumen

Los estrógenos son hormonas esteroides que participan en múltiples procesos fisiológicos relacionados con la reproducción, el sistema cardiovascular, el sistema óseo, la memoria etc. Sin embargo la disminución de estrógenos durante la menopausia ha generado la necesidad de diseñar estrategias clínicas para reemplazar esta disminución. Actualmente se utilizan compuestos con actividad estrogénica para el tratamiento de la menopausia y sus consecuencias vasculares y óseas, en la anticoncepción asociados a progestinas, así como para el tratamiento y profilaxis del cáncer de mama dependiente de estrógenos, principalmente. Dentro de los compuestos más utilizados podemos mencionar al

estradiol micronizado, las sales de estradiol, estrógenos conjugados equinos, etinilestradiol, mestranol, raloxifeno, tamoxifeno y fulvestrant.

Palabras clave: estradiol, etinilestradiol, raloxifeno, tamoxifeno, fulvestrant.

Abstract

Estrogens are steroid hormones involved in multiple physiological processes related to reproduction, cardiovascular system, skeletal, memory, etc. However the drop of estrogens during menopause has generated the need to design clinical strategies to compensate this diminution. Actually there are many compounds with estrogenic-like activity for menopause treatment, contraception associated with progestins, and for breast cancer treatment or prophylaxis. Some of the most useful compounds are micronized estradiol, salts of estradiol, conjugated equine estrogens, ethinylestradiol, mestranol, raloxifene, tamoxifene, and fulvestrant.

Key words: estradiol, ethinylestradiol, raloxifene, tamoxifene, fulvestrant.

Contenido de la revisión

1. Introducción.
2. Hormonas estrogénicas.
3. Estrógenos naturales. Estradiol micronizado, sales de estradiol, estrógenos conjugados equinos.
4. Estrógenos semisintéticos. Etinilestradiol y mestranol.
5. Estrógenos sintéticos. Moduladores selectivos del receptor de estrógenos. Raloxifeno y tamoxifeno.
6. Antagonistas del receptor de estrógenos. Fulvestrant.
7. Conclusión.

1. Introducción

Los estrógenos son un grupo de hormonas con estructura esteroidea con afinidad por receptores estrogénicos alfa o beta y llevan a cabo sus acciones a través de mecanismos genómicos o no genómicos. Sin embargo existen otros compuestos que también pueden ser considerados estrógenos ya que comparten

la afinidad por el receptor, algunos semejan efectos estrogénicos y otros los bloquean, con estructura esteroidea o diferente, de origen animal o vegetal, semisintéticos o sintéticos, etc., (figura 1).

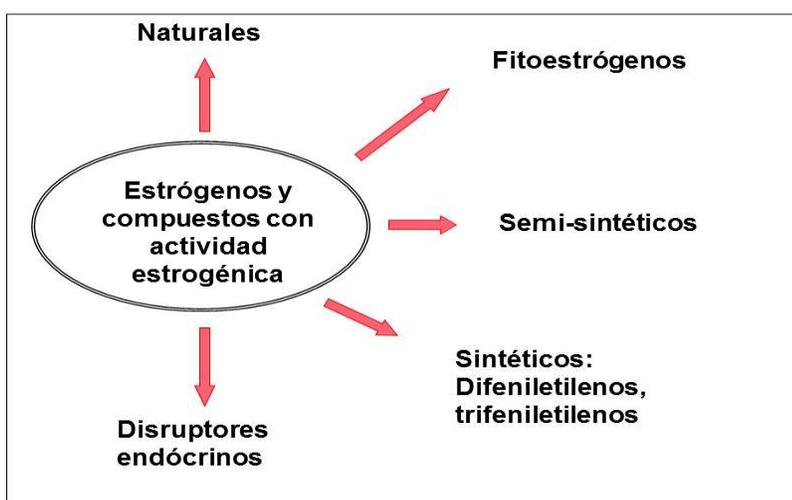


Figura 1. Clasificación de estrógenos naturales y fármacos con actividad estrogénica.

2. Hormonas estrogénicas

Las principales hormonas estrogénicas que biosintetiza el organismo son: el estradiol (figura 2), la estrona y el estriol. El sitio principal de biosíntesis de los estrógenos es la célula de la granulosa del ovario a partir de colesterol y andrógenos como intermediarios.

Los estrógenos participan en importantes procesos fisiológicos que comienzan desde la etapa embrionaria hasta la posmenopausia. Estos eventos comprenden entre otros la esteroidogénesis y la gametogénesis, que permiten la diferenciación sexual así como el desarrollo de las características sexuales secundarias y la reproducción. Sin embargo además de estas funciones se conoce que los

estrógenos también actúan sobre el sistema cardiovascular, sistema óseo, glándula mamaria, cerebro, etc; [1].

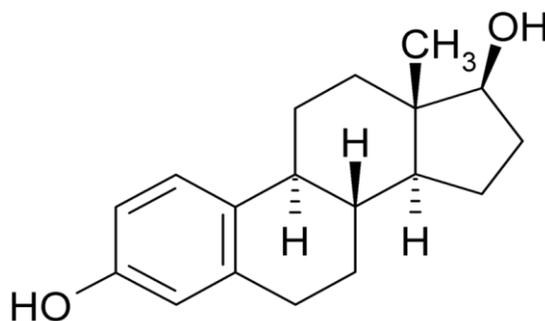


Figura 2. Estructura química del estradiol: 1,3,5 (10)-estratrien-3,17 β -diol.

Dada la importancia fisiológica de las hormonas estrogénicas y su participación en varios órganos y tejidos, se han desarrollado fármacos que semejen o bloqueen la actividad de los estrógenos naturales con la finalidad de utilizarlos en la prevención del embarazo, en la terapia de reemplazo, en la profilaxis de cáncer de mama, en la prevención de pérdida ósea, como cardioprotectores, en dismenorrea, etc., [2].

3. Estrógenos naturales: estradiol micronizado, sales de estradiol y estrógenos conjugados equinos.

Terapia de reemplazo hormonal. Los estrógenos mas utilizados para el reemplazo hormonal son los estrógenos conjugados de origen equino, una mezcla de estrógenos que incluye equilina, equilenina, estrona y sales de estradiol, también se utiliza el estradiol micronizado, estriol y las sales de estradiol (benzoato, valerato, enantato, cipionato y succinato) [3].

4. Estrógenos semisintéticos: etinilestradiol y mestranol

Anticoncepción. En las formulaciones anticonceptivas los estrógenos que se utilizan se administran conjuntamente con una progestina sintética que puede ser

de primera, segunda o tercera generación (noretisterona, levonorgestrel, gestodeno, respectivamente). Los estrógenos más utilizados son el etinilestradiol (figura 3) y su éster metilado: el mestranol. Los estrógenos semisintéticos que se utilizan en anticoncepción solo forman parte de las formulaciones bifásicas y trifásicas debido a que las monofásicas solo están compuestas por la progestina [4].

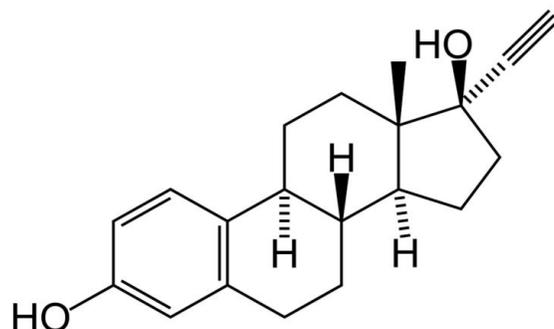


Figura 3. Estructura química del etinilestradiol.

Farmacocinética de estrógenos naturales y semisintéticos

Los estrógenos naturales y semisintéticos se administran por vía oral a excepción el estradiol que se metaboliza rápidamente a través del sistema porta-hepático. La mayoría de las formulaciones que se utilizan en anticoncepción y terapia hormonal de reemplazo se administran por vía oral por deglución. Sin embargo también existen formulaciones para su administración por vía intramuscular, transdérmica, tópica, etc; en forma de parches, cremas y óvulos.

Efectos adversos

Los efectos adversos mas comunes relacionados con la administración de estrógenos son: náusea, vómito, jaqueca, retención de líquidos, sin embargo existen otros efectos adversos mas graves que son principalmente el cáncer cérvico-uterino, cáncer de mama y trombosis venosa.

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que existe un aumento en la incidencia de tromboembolismo venoso con la administración de estrógenos. Al parecer la dosis del estrógeno está relacionada a este riesgo y a través del tiempo se ha disminuido esta dosis con el objetivo de evitar o disminuir estos efectos adversos [5-9].

5. Estrógenos sintéticos. Moduladores selectivos del receptor de estrógenos. Raloxifeno y tamoxifeno.

Existe otro grupo importante de fármacos con actividad estrogénica denominados moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs, selective estrogen receptor modulators) ya que dependiendo del tejido pueden actuar como agonistas o antagonistas parciales. Los moduladores selectivos más utilizados son el raloxifeno y el tamoxifeno (primera generación; figura 4), pero existen otros nuevos fármacos a los que se les denomina de segunda y tercera generación y comprenden a toremifeno, droloxifeno, idoxifeno, arzoxifeno, ospemifeno, etc.

Raloxifeno

El raloxifeno (clorhidrato de raloxifeno) es un derivado de benzotiofeno, sólido de color amarillo pálido con baja solubilidad en agua (figura 4).

Indicaciones terapéuticas

El raloxifeno está indicado en el tratamiento y la prevención de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. La dosis recomendada es una tableta de 60 mg diariamente.

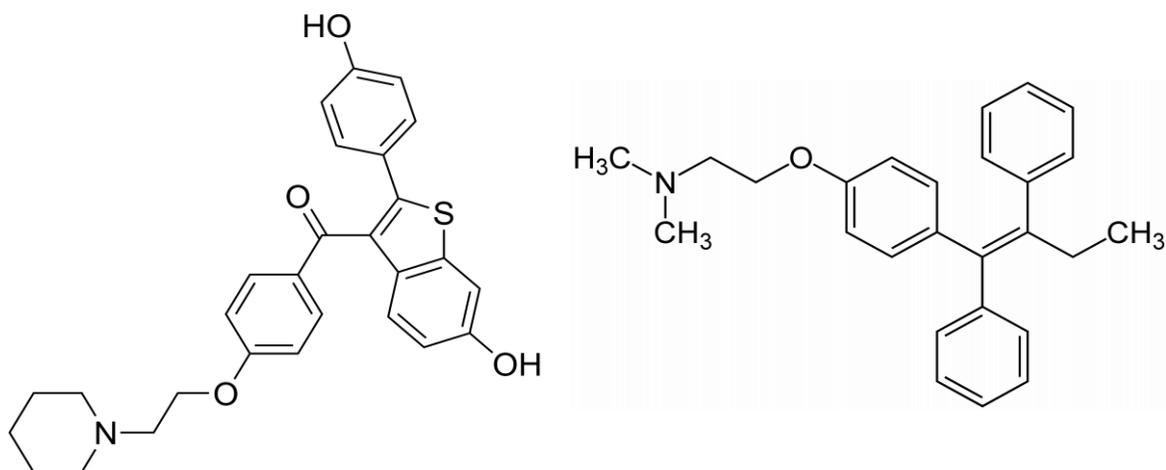


Figura 4. Estructura química del raloxifeno y tamoxifeno.

La osteoporosis es la pérdida generalizada del hueso lo cual resulta en un aumento del riesgo de fracturas en alrededor 20 a 25 millones de personas en los Estados Unidos. Mientras que una forma de osteoporosis está asociada con la edad, una segunda forma está asociada a una rápida pérdida del hueso que ocurre en la mayoría de las mujeres después de la menopausia. La deficiencia de estrógenos incrementa esta pérdida ósea debido a que la resorción del hueso ocurre más rápido que la formación lo que conlleva a la pérdida neta de la densidad mineral ósea, principalmente en el compartimiento trabecular [10].

En el mes de septiembre de 2007 la Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA) aprobó la venta del clorhidrato de raloxifeno por su capacidad de reducir el riesgo de cáncer invasivo de mama y osteoporosis en mujeres posmenopáusicas.

La seguridad y eficacia del raloxifeno en la reducción del riesgo de cáncer de mama invasivo en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis se demostró en tres estudios clínicos: El MORE, el RUTH y el CORE. (Multiple Outcomes of

Raloxifene Evaluation; Raloxifene Use for the Heart; Continuing Outcomes Relevant to Evista) [11, 12].

Mecanismo de acción

El raloxifeno se une a receptores de estrógenos y de esta manera actúa como un co-activador o co-represor en la señalización de los estrógenos. La disminución en los niveles de estrógenos después de una ooforectomía o la menopausia está relacionada con el aumento de la resorción ósea y la aceleración de la pérdida del hueso. La falta de estrógenos provoca un desequilibrio entre la formación y la resorción ósea debido al deterioro de osteoblastos y sus precursores. El raloxifeno disminuye la resorción ósea y mejora el recambio óseo. Los efectos sobre hueso son evaluados por la reducción de los niveles séricos y urinarios de los marcadores de recambio óseo. La disminución de la resorción se analiza en estudios cinéticos, aumento de la densidad mineral ósea y la disminución en la incidencia de fracturas.

Farmacocinética

El raloxifeno es administrado por vía oral y se absorbe alrededor del 60%. La biodisponibilidad absoluta del raloxifeno es del 2%. La administración conjunta del raloxifeno con una dieta rica en grasas aumenta su absorción, sin producir cambios en la farmacodinamia. El raloxifeno y sus metabolitos conjugados se unen a las proteínas plasmáticas en un 95%. El raloxifeno se une a la albúmina y a la glicoproteína alfa-1 pero no se une a la globulina transportadora de hormonas esteroideas. La biotransformación del raloxifeno en humanos se realiza mediante la administración de raloxifeno marcado con el radioisótopo carbono 14. El raloxifeno se biotransforma por la vía entero-hepática a sus conjugados glucuronados: glucuronato de raloxifeno 4', glucuronato 6' y diglucuronato 4-6'. Solo estos metabolitos se han detectado lo que indica que el metabolismo del raloxifeno no involucra al citocromo P-450. Tiene tiempo de vida media de aproximadamente 25 hrs y su principal vía de eliminación es digestiva.

Efectos adversos

La administración del raloxifeno está asociada con un incremento del riesgo de trombosis venosa profunda y embolismo pulmonar por lo que su administración deberá evitarse en aquellos pacientes que presenten, hayan presentado o tengan antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, tromboembolismo venoso, infarto, cáncer de mama.

Tamoxifeno

El tamoxifeno (citrato de tamoxifeno) es otro modulador selectivo de receptor de estrógenos que pertenece a la familia de los trifeniletlenos con diversos efectos farmacológicos (figura 4).

Indicaciones terapéuticas

El tamoxifeno se administra por vía oral en dosis entre 20-40 mg por día y está indicado en el tratamiento y profilaxis de cáncer de mama dependiente de estrógenos en mujeres y hombres, solo o en combinación con otros tratamientos quirúrgicos (ovariectomía) o farmacológicos (antiestrógenos, inhibidores de aromatasas). El tamoxifeno puede utilizarse en cáncer con metástasis, en cáncer recientemente detectado en pacientes que han sido tratados con cirugía, radioterapia o quimioterapia, para reducir el riesgo de desarrollar un tipo de cáncer de mama mas grave en aquellas pacientes con carcinoma ductal y que ya han recibido tratamiento quirúrgico o radioterapia y también para reducir el riesgo de cáncer de mama en mujeres con antecedentes familiares, historia médica y por la edad.

Otros usos menos frecuentes del tamoxifeno son como inductor de la ovulación, para el tratamiento de ginecomastia en hombres, como anti-angiogénico y en desorden afectivo bipolar aunque el mecanismo de acción de este último tratamiento está en estudio [13,14].

Mecanismos de acción

El mecanismo de acción de tamoxifeno en tejido de mama, es mediado a través de su unión con receptores estrogénicos y bloquear la proliferación del epitelio mamario. El efecto antiproliferativo del tamoxifeno se lleva a cabo mediante la inducción de la síntesis del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que actúa como un regulador negativo autócrino. Otro mecanismo propuesto es que el tamoxifeno disminuye las concentraciones circulantes de crecimiento insulínico tipo 1 en pacientes con cáncer, debido a que este factor es un potente mitógeno y puede actuar a través de mecanismos endócrinos, parácrinos y autócrinos para estimular el crecimiento [15, 16, 17].

Farmacocinética

El tamoxifeno se administra por vía oral y se absorbe en tracto digestivo y alcanza una biodisponibilidad entre el 80-85%. Se distribuye y alcanza concentraciones máximas entre las 4-5 hrs. Su biotransformación en el hígado es de 85% mediante citocromo P450. Sus metabolito mas activos son el 4-hidroxi-tamoxifeno y el N-demetiltamoxifeno con afinidad y eficacia. La mayoría de sus metabolitos son conjugados. En dosis repetidas el tamoxifeno alcanza el estado estable entre 6 a 8 semanas y su tiempo de vida media es de 14 días. Su principal vía de eliminación es digestiva.

Efectos adversos

Debido a que el tamoxifeno es un agonista del receptor de estrógenos en el endometrio, uno de sus efectos adversos está relacionado al aumento de cáncer de endometrio y de la misma manera que otros estrógenos con el aumento en la incidencia de trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

Farmacocinética

El fulvestrant es administrado por vía intramuscular cada 30 días y alcanza su concentración máxima sérica alrededor de los primeros 7 días del tratamiento y se mantienen durante 30 días con una concentración mínima estimada del 30% de su concentración máxima. Tiene un tiempo de vida media de 10 días y se distribuye ampliamente en el organismo y se une en un 99% a proteínas plasmáticas. Su metabolismo es por vía hepática mediante reacciones de oxidación, hidroxilación y conjugación con glucuronatos. Se elimina principalmente por vía digestiva (90%) y una mínima porción por vía renal.

Efectos adversos

El fulvestrant produce algunos trastornos gastrointestinales como náuseas, vómito, dolor abdominal, diarrea o constipación. También puede producir cefalea, sofocos, mialgias, vértigo y leucopenia. En mujeres en edad fértil puede producir infertilidad.

7. Conclusión

Los estrógenos naturales, semisintéticos y sintéticos, son compuestos con importantes aplicaciones terapéuticas. El uso de estrógenos es diverso debido a sus diferentes efectos y sitios de acción. La diversidad de estos efectos se debe a varios factores, entre ellos las diferencias en su estructura química, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de cada compuesto, el efecto tejido-específico y la interacción con otras moléculas independientes del receptor específico de estrógenos, lo que genera respuestas en otros tejidos diferentes a los reproductivos.

La investigación básica y clínica continúa enfocada hacia el diseño de fármacos más específicos y seguros, en la evaluación farmacológica de nuevos compuestos y en la vigilancia de las reacciones adversas de los medicamentos en uso.

Bibliografía

1. Ing, N.H., O'Malley, B.W. (1995) *Molecular endocrinology: basic concepts and clinical correlations*. Weintraub BD (Ed) Raven Press, Ltd NY.
2. Ellman, S., Sticht, H., Thiel, F., Beckmann, W.M., Strick, R., y Strissel, L.P. (2009) *Cell Mol Life Sci.* **66** (15), 2405-26.
3. Million Women Study Collaborators. (2002) *B.J.O.G.* **109**, 1319-1330.
4. Rosendaal, F.R., Helmerhorst, F.M., Vandenbroucke, J.P. (2001). *Thromb Haemost.* **86**, 112-123.
5. Jordan, W.M. (1961) *Lancet.* **ii**, 1146-1147.
6. Lorentz, I. (1962) Parietal lesions and Enavid. *B.M.J.* **ii**, 1191.
7. Boyce, J., Fawcett, J.W. y Noall, E.W.P. (1963) *Lancet* **1**, 111.
8. Kwang, K.K., McDonald, K., Horne, III. y Cannon, R. O. III. (1999) *Thromb Haemost.* **82**(2), 626-633.
9. Rosendaal, F.R. (1999) *Lancet.* **353**, 1167-1173.
10. Bryant, U.H., Glasebrook, L.A., Yang, N.N. y Sato, M. A. (1996) *J. Bone and Mineral Metab.* **14**, 1-9.
11. Dias, A.R. Jr., Melo, R.N., Gebara, O.C., D'Amico, E.A., Nussbacher, A., Halbe, H.W. y Pinotti, J.A. (2005) *Climacteric.* **8** (1), 63-70.
12. Delmas, P.D., Bjarnason, N. H., Mitlak, B., Ravoux, A. C., Shah, A.S. y Huster, W.J. (1997) *New Eng. J. Med.* **337** (23), 1641-1647.
13. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). (2011) *Lancet.* **378** (9793), 771-784.
14. Vogel, V.G., Costantino, J.P. y Wickerham, D.L. (2010) *Cancer Prevention Research.* **3**(6), 696-706.
15. Knabbe, C., Lippman, M.E. y Wakefield, L.M. (1987) *Cell.* **48**, 417-428.
16. Colletta, A.A., Wakefield, L.M. y Howell, L.M. (1990) *Br. J. Cancer.* **62**, 405-409.
17. Butta, A., MacLennan, K. y Flanders, K.C. (1992) *Cancer Res.* **52**, 4261-4264.
18. Howell, J.F.R., Robertson, J., Quaresma, A.A., Aschermannova, L., Mauriac, U.R., Kleeberg, I., Vergote, B., Erikstein, A., Webster, y Morris, C. (2002) *J. Clin. Oncology.* **20**, 3396-3403.
19. Wakeling, A. E., Dukes, M. y Bowler, J. (1991) *Cancer Res.* **51**, 3867-3873.

Semblanza de la Dra. Ruth Jaimez Melgoza.

Estudió la carrera de Químico-farmacobiología en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Posteriormente realizó sus estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas en la Universidad Nacional Autónoma de México. Trabaja en la evaluación farmacológica de compuestos con actividad estrogénica en modelos *in vivo* e *in vitro*. En el año 2005 recibió la beca FOGARTY de los Institutos de Salud de Estados Unidos de Norteamérica para realizar una estancia Posdoctoral por dos años en el Center for Research on Reproduction and Women's Health en la Universidad de Pensilvania. Actualmente es Profesora Asociada "C" de tiempo completo en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, tutora en la Facultad de Química y Profesora del curso de Farmacología de Estrógenos en el Doctorado en Ciencias Biomédicas en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedicatoria:

Quiero dedicar este trabajo a mis padres la Profra. Esperanza Melgoza Valencia y el M. en I. Vicente Jaimez Gutiérrez porque desde niña me dieron la libertad y las bases para que todas mis metas académicas se logaran a través de su ejemplo de constancia, trabajo y disciplina, pero sobre todo el amor por lo que te gusta hacer y ver como los sueños de antes se han hecho realidades y mejor aún han sido superados. Gracias padres los Amo.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 275 – 291, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADA POR CINASAS DE LA FAMILIA SnRK

SIGNAL TRANSDUCTION MEDIATED by FAMILY KINASES SnRK

Alejandra Avila, Eleazar Martínez, Patricia Coello

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM
Ciudad Universitaria, CP 04510, México DF
pcoello@unam.mx

RESUMEN

La familia de las cinasas Sucrose non-fermenting related kinases (SnRKs), toman su nombre de su homólogo en levadura, SNF1, que funciona como un regulador global del metabolismo. En *Arabidopsis thaliana*, la familia SnRK consta de 38 miembros y está dividida en tres subfamilias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3. Las SnRK1 tienen una distribución muy amplia y participan en muchos procesos, dentro de los que destacan la regulación del metabolismo de nitrógeno y carbono. Las SnRK2 y SnRK3 son cinasas exclusivas de plantas que coordinan las respuestas a estreses osmótico y salino. En esta revisión, describiremos a la familia de las SnRKs, sus características estructurales y su papel en los diversos procesos metabólicos y celulares.

Palabras Claves: SnRKs, metabolismo, fosforilación, estrés osmótico, tolerancia salina.

ABSTRACT

Sucrose non-fermenting-1 (SNF1)-related protein kinases (SnRKs) take their name from their fungal homologue, SNF1, a global regulator of carbon metabolism. In *Arabidopsis thaliana* the SnRK family has 38 members, which can be divided into three sub-families: SnRK1, SnRK2, and SnRK3. SnRK1 has been widely studied because they directly participate in the regulation of nitrogen and carbon metabolism. SnRK2 and SnRK3 are exclusively plant kinases involved in responses to osmotic and salinity stress. In this review, we will describe their structural characteristics and their role in several metabolic and cellular processes.

Key words: SnRKs, metabolism, phosphorylation, osmotic stress, salinity tolerance.

Familia de cinasas tipo SnRK

La familia de cinasas tipo SnRK comprende un grupo de cinasas que están involucradas con adaptaciones metabólicas en respuesta a diversos tipos de estrés. Está dividida en tres subfamilias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3. Las SnRK1 son enzimas evolutivamente relacionadas a reguladores metabólicos presentes en mamíferos (5'AMP activated protein kinases, AMPK) y levaduras (Sucrose Non-Fermenting 1, SNF1), con las cuales comparte cerca del 47% de identidad en la secuencia de amino ácidos dentro del dominio catalítico [1]. Las cinasas de la subfamilia SnRK1 son complejos heterotriméricos formados por una subunidad catalítica y dos subunidades reguladoras; cuyas secuencias se han conservado evolutivamente.

En comparación, las SnRK2 son enzimas monoméricas y las SnRK3 interaccionan con una subunidad que une Ca^{2+} similar a calcineurina (calcineurin B-like proteins, CBL). Las SnRK2 y SnRK3 se encuentran menos relacionadas con las AMPK y SNF1, por lo que se sugiere que son producto de un evento independiente de duplicación génica y de la evolución que les permitió asumir nuevos papeles durante la adaptación de las plantas a las condiciones de un ambiente cambiante. En *Arabidopsis thaliana*, planta modelo en donde se han realizado muchos estudios, existen tres genes que codifican para la subunidad catalítica de la SnRK1, 10 genes que codifican para la SnRK2 y 25 genes que codifican para la SnRK3. Muchos resultados indican

que las SnRK1 funcionan coordinando modificaciones metabólicas en respuesta a estreses energéticos, mientras que las SnRK2 y SnRK3 están directamente involucradas en las respuestas a estreses abióticos como sequía, osmótico y salinidad (Fig. 1) [2].

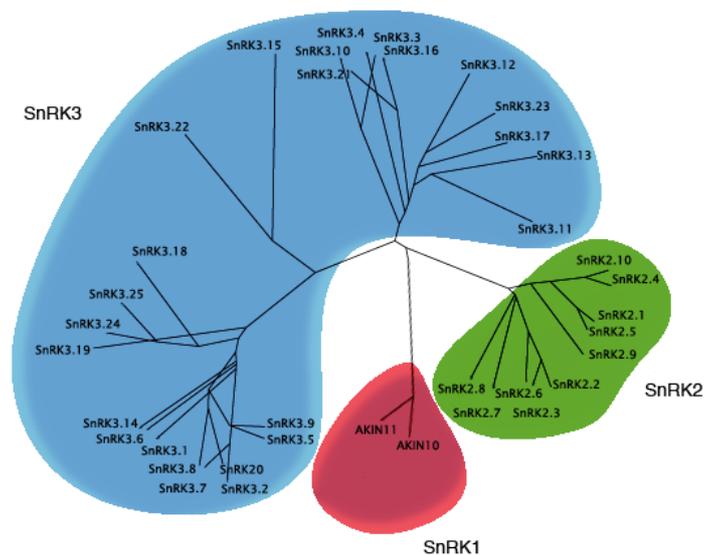


Figura 1. La familia de cinasas SnRK1 está dividida en tres subfamilias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3. El diagrama representa la relación evolutiva entre las proteínas que se encuentran en *Arabidopsis thaliana*.

Función de la subfamilia de cinasas SnRK1

Metabolismo de Carbono y Nitrógeno

Muchos reportes han documentado el papel de las SnRK1 en la detección del déficit energético causado por falta de nutrientes, estreses ambientales y ciclos alternados de luz-obscuridad [2,3], lo que ha contribuido a que estas enzimas sean reconocidas como reguladores globales del metabolismo de las plantas. Las SnRK1 son necesarias para la biosíntesis de almidón en hojas y en órganos de almacenamiento como semillas y tubérculos [3]. La sobreexpresión de la *SnRK1* de una especie arbórea (*Malus hupehensis*) en jitomate, incrementó el contenido de almidón hasta en un 70% [4]. Estos resultados son consistentes con los de otros estudios donde se propone que las SnRK1 tienen un papel regulador en la acumulación de

almidón en el día y su movilización durante la noche [5,6,7]. No se conoce el mecanismo bioquímico de cómo la actividad de SnRK1 afecta el metabolismo de almidón, pero se ha observado que tubérculos de papa que sobreexpresan a la *SnRK1*, aumentan la expresión y la cantidad de sacarosa sintasa y ADP glucosa pirofosforilasa, dos enzimas claves en la biosíntesis del almidón [5]. La regulación de la actividad de la ADP glucosa pirofosforilasa también involucra un proceso de activación dependiente de los cambios que en el ambiente redox propicia la disponibilidad de sacarosa. Plantas transgénicas con baja actividad de *SnRK1* son incapaces de establecer esta conexión [8].

Además de modificar directamente el metabolismo de carbohidratos, las SnRK1 también participan en regular procesos de desarrollo promovidos por azúcares. Se ha observado que plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen de la subunidad catalítica *SnRK1.1*, cuando son cultivadas en presencia de glucosa al 6 %, manifiestan un aumento importante en la actividad de SnRK1 y un fenotipo de hipersensibilidad a glucosa caracterizado por un retraso en el crecimiento de las hojas y ausencia del desarrollo de la raíz. La sacarosa también retrasa el crecimiento, sin embargo, al aumentar la actividad de SnRK1 no se modifica la forma como las plantas la perciben [9].

El crecimiento de las plantas es altamente dependiente de la disponibilidad de carbono y de nitrógeno, cuyos niveles pueden regular la expresión de muchos genes. Sin embargo, el efecto de nitrógeno está fuertemente influenciado por azúcares y viceversa, lo que habla de la fuerte interacción entre las vías de transducción de señales involucradas [10]. Por otro lado, desde hace muchos años se conoce que la Nitrato Reductasa es sustrato directo de cinasas independientes de Ca^{2+} , dentro de las cuales se encuentran las SnRK1 [2]. La enzima se fosforila y posteriormente, el sitio es reconocido por las proteínas 14-3-3 para su inactivación [11].

En un contexto más amplio, la percepción de la cantidad de azúcares y aminoácidos disponibles para el crecimiento celular depende de procesos de señalización antagónicos en donde participan las cinasas TOR (*target of rapamycin*) y AMPK/SNF1/SnRK1. TOR contribuye a transformar la disponibilidad de nutrientes e integridad celular en estímulos proliferativos que promueven la división y el crecimiento celulares [12]. En plantas (particularmente en *A. thaliana*), las mutaciones en el gen que codifica para TOR son letales desde el estado embrionario, indicando que su función es necesaria a lo largo de todo el desarrollo [13]. Así como TOR es activado en condiciones favorables de energía y nutrientes, la actividad de SnRK1 se estimulada en condiciones de carencia de nutrientes y energía [12]. La red de señalización resultante permite regular en forma global muchos procesos relacionados con metabolismo, crecimiento y desarrollo.

Respuesta a hormonas

Las plantas producen una gama muy amplia de hormonas que funcionan como mediadores efectivos entre las condiciones ambientales (adversas o convenientes) que estimulan su producción y las adecuaciones fisiológicas o metabólicas que deben implementar para adaptarse al medio. El Acido Abscísico (ABA) es una hormona que las plantas producen durante el desarrollo de la semilla o cuando son sometidas a condiciones desfavorables. A pesar de que el ABA tiene muchos efectos sobre la fisiología de las plantas, resultó sorprendente que plantas mutantes que no responden a la presencia de azúcares fueran al mismo tiempo identificados como mutantes en la respuesta a ABA [10]. Algunos estudios han demostrado que durante el desarrollo de la semilla, la expresión de los genes que codifican para las subunidades catalíticas y reguladoras de la SnRK1 se estimulan por adición de ABA y se inhiben por Ácido Giberélico (GA). Adicionalmente, en plántulas la expresión de esos genes se estimula en respuesta a déficit hídrico o cuando las hojas se tratan con ABA [14]. Por su parte, la inhibición de la expresión de la subunidad catalítica, ha demostrado que si la actividad de SnRK1 disminuye, se retrasa el desarrollo de la semilla y limita la capacidad para acumular

reservas. Este fenotipo es muy parecido al que ocurre en mutantes insensibles a ABA, como es el caso del mutante *abi-3* de *Arabidopsis* [15]. Estos resultados sugieren que algunas de las respuestas a ABA podrían estar mediadas por la SnRK1.

Función durante el desarrollo

Además de ser un regulador importante del metabolismo, las cinasas SnRK1 también están involucradas en la coordinación del crecimiento y desarrollo. Plantas de cebada en donde se disminuyó la expresión de la subunidad catalítica, produjeron polen que no acumuló almidón y cuyo desarrollo se detuvo en el estado binucleado [16]. En las plantas estudiadas, la subunidad catalítica es codificada por más de un gene, por lo que para obtener una pérdida de función, es necesario bloquear la expresión de todos ellos, lo cual tiene consecuencias fatales. Para obtener plantas funcionales de *Arabidopsis* con una doble mutación en los genes de las subunidades catalíticas *akin10* y *akin11*, Baena-Gonzalez *et al*, (2007) infectaron plantas con un virus e indujeron su silenciamiento de manera transitoria. Los resultados mostraron que la doble mutante produce hojas pequeñas y curvadas, con peciolo cortos, acumulación de antocianinas y síntomas de senescencia precoz.

Estos defectos no desaparecieron con iluminación constante ni suplementando sacarosa, lo cual indica que el fenotipo observado no se debe a un déficit energético y que las SnRK1 están involucradas en el control del crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas [6]. Las SnRK1 también participan en el crecimiento y desarrollo de las semillas. Plantas transgénicas de chícharo donde la actividad de cinasa se abate en un 50-70%, presentan una tasa de aborción que va del 10 al 20%. Esto sugiere que el remanente de actividad (30-50%) representa el límite mínimo necesario para completar el desarrollo y alcanzar la madurez. Adicionalmente, las plántulas que producen esas semillas tienen alterada la simetría y la forma de los cotiledones,

indicando una función de las SnRK1 en el control de la división y elongación celulares [15].

Estructura del complejo

Las proteínas cinasas SnRK1 funcionan como complejos heterotriméricos que requieren una subunidad catalítica α y dos subunidades regulatorias β y γ . En *Arabidopsis* existen 3 genes que codifican para la subunidad α (*akin10*, *akin11* y *akin12*) de los cuales solamente se expresan 2, por lo que el tercero (*akin12*) probablemente sea un pseudogen. Esta familia de cinasas es evolutivamente muy conservada y la identificación de las subunidades se basa en experimentos de complementación funcional.

La subunidad catalítica es la que tiene el grado más alto de conservación entre las especies, en particular en el dominio de cinasa. Existe una treonina conservada en el asa de activación cuya fosforilación por cinasas río arriba es necesaria para que el complejo se active. La porción C-terminal tiene un dominio de autoinhibición y un dominio de interacción con la subunidad β . Se postula que durante la formación del complejo, la subunidad γ interacciona con el dominio de autoinhibición liberándolo de esa regulación [1]. En plantas las subunidades regulatorias β y γ , también se encuentran representadas por más de un gen [17]. La subunidad β en *Arabidopsis* está codificada por tres genes diferentes. Dos de ellos (*akin β 1* y *akin β 2*) codifican para una proteína con 2 dominios característicos: el dominio de unión a glucógeno (GBD), que funciona como un dominio de reconocimiento a diferentes carbohidratos y el dominio de unión a las subunidades α y γ (ASC) que sirve como andamiaje para la formación del complejo. El tercer gen, *akin β 3*, codifica para una proteína de menor peso molecular que carece del dominio GBD y que solo está presente en plantas. Esta proteína es capaz de complementar una mutante de levadura, indicando que la ausencia del GBD no le impide interactuar con las otras subunidades (Fig. 2) [18].

La otra subunidad regulatoria está codificada por el gen *akin γ* . Fue identificada haciendo una búsqueda en las bases de datos utilizando regiones conservadas de las proteínas de mamíferos y levaduras. Un análisis de la secuencia de la proteína revela una identidad del 23% con la AMPK γ de mamíferos y 25% con SNF4 de levaduras [19]. A nivel estructural la proteína se caracteriza por presentar un extremo N-terminal muy divergente y dos pares de motivos repetidos de cistation β sintasa (CBS), denominados dominios Bateman, que unen derivados de adenosina. Se ha reportado que las subunidades regulatorias de animales pueden unir AMP, ADP y ATP en estos motivos. La unión del AMP resulta en una activación alostérica, mientras que el ATP antagoniza los efectos del AMP. Estas observaciones condujeron a la hipótesis de que la AMPK podría monitorear los cambios en la relación AMP/ATP dentro de la célula [20]. La subunidad γ de plantas no es activada alostéricamente por el AMP, pero su unión evita que la fosfatasa desfosforile la treonina en el asa de activación, impidiendo la desactivación del complejo [21].

Adicionalmente, las plantas expresan un gen que codifica para una subunidad regulatoria atípica que tiene características tanto de las subunidades normales β (dominio GBD) como de las subunidades γ (dominios Bateman), razón por la cual se le denominó subunidad $\beta\gamma$ (Fig. 2). Funcionalmente, la subunidad $\beta\gamma$ actúa como una subunidad γ ya que es capaz de complementar mutantes de levadura [22]. Se ha demostrado a través de estudios de doble híbrido en levaduras, que esta subunidad interacciona tanto con la subunidad catalítica como con las subunidades β del complejo SnRK1 [23].

Estos resultados han permitido postular la hipótesis de que en plantas, el complejo activo podría estar formado por alguna de las subunidades catalíticas y la subunidad $\beta\gamma$, permitiendo la formación de un complejo dimérico. Esta hipótesis se favorece por el hecho de que a nivel de secuencia, el gen que codifica para la $\beta\gamma$ está evolutivamente más cercano a los genes de la subunidad γ de mamíferos y levaduras, haciéndolo un candidato más fuerte

para formar parte del complejo, que la subunidad AKIN γ descrita inicialmente [22] (Fig. 2).

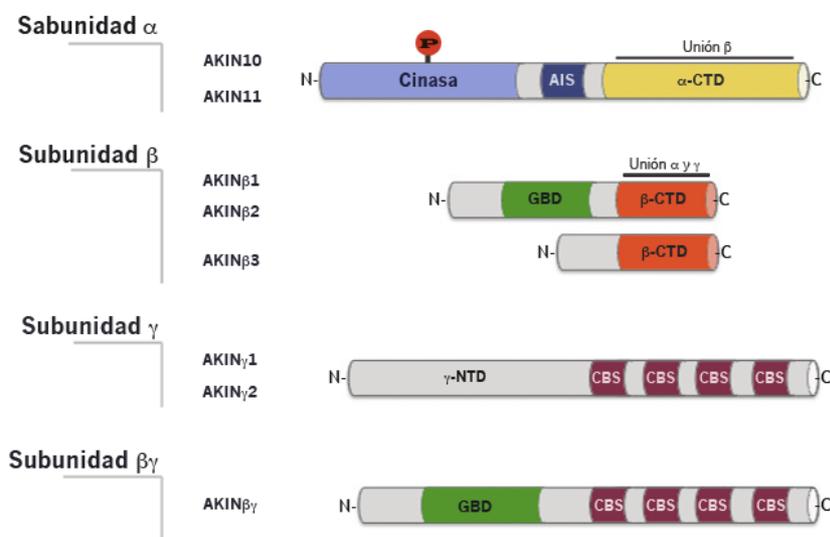


Figura 2. Estructura de las diferentes subunidades que forman parte del complejo heterotrimérico de la SnRK1 en *Arabidopsis thaliana*.

Mecanismo de acción de las SnRK1

Las SnRK1 impactan sobre las rutas metabólicas de dos maneras: 1) transcripcionalmente; contribuyendo a regular la expresión de genes que codifican para enzimas que participan en ellas ó 2) post-traduccionamente, pues la fosforilación de sitios específicos puede modificar tanto la actividad de las enzimas como su interacción con otras proteínas.

Regulación por modificación transcripcional

Las SnRK1 participan en la regulación genética de un amplio número de genes. Se predice que bajo condiciones de estrés energético, las SnRK1 inducen la expresión de aproximadamente 300 genes involucrados en la utilización de fuentes alternativas de energía. Al mismo tiempo reprimen la expresión de un número similar de genes participantes en la síntesis de sacarosa, almidón, aminoácidos, lípidos, etc. [24,7]. Se ha observado que en plantas de *Solanum tuberosum* que no expresan *SnRK1*, la expresión de la sacarosa sintasa también se ve disminuida [25], mientras que en arroz y trigo

se demostró que el promotor del gen de la α -amilasa (α -Amy2) es reprimido por SnRK1 [26,27].

Algunos de los genes cuya expresión es activada por las SnRK1, codifican para proteínas necesarias para movilizar o hacer más eficiente el flujo de nitrógeno de la célula, entre ellos se encuentran la fosfoenol piruvato carboxilasa (*PEPCK*), piruvato fosfato diquinasa (*PPDK*), piruvato cinasa (*PK*), glutamato hidrogenasa (*GDH*) y los genes *DIN* (*dark-induced*). El mecanismo de activación de la expresión génica involucra la fosforilación de factores de transcripción que unen a motivos específicos en los promotores de los genes. Un ejemplo es la proteína GFB5 que al unirse a cajas G dentro en el promotor del gen *DIN6-LUC* promueve su transcripción. La activación del gen *DIN6* depende directamente de AKIN10 [6].

Modificación postraduccional: estado de fosforilación de enzimas claves.

Para establecer la función fisiológica de las SnRK1 en el metabolismo, es importante encontrar las características de sus proteínas blanco. Dentro de los blancos confirmados se encuentran:

- La 3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR-CoA reductasa); esta enzima cataliza el primer paso de la vía del mevalonato (MVA) para la biosíntesis de isoprenoides [28]. En plantas, los isoprenoides son moléculas importantes para el crecimiento y desarrollo celular, funcionan en la biogénesis de membranas, en el proceso de respiración y también participan en la respuesta de defensa contra patógenos. Dada su localización en el retículo endoplasmático, son usados en la modificación postraduccional de proteínas [29,30]. La SnRK1 fosforila a la HMGR-CoA e inhibe su actividad como respuesta a diferentes estímulos como cambios en la concentración de fitohormonas, calcio, calmodulina y ataque por patógenos [28,31].
- Sacarosa fosfato sintasa (SPS). Muchas plantas utilizan a la sacarosa para distribuir los productos de la fotosíntesis. La síntesis de sacarosa involucra la

participación de 2 enzimas: la SPS que cataliza la reacción entre UDP-glucosa y D-fructosa 6-P para formar sacarosa-P y la sacarosa fosfato-fosfatasa (SPP), responsable de la eliminación del fosfato. Además de la fosforilación, la actividad de la SPS también es regulada post-traduccionalmente por la unión de proteínas 14-3-3 [11]. Dada la importancia del metabolismo de la sacarosa, su alteración repercute directamente en el crecimiento celular y en el estado energético de la planta.

- Nitrato reductasa (NR). La nitrato reductasa está involucrada en el primer paso de la asimilación del nitrógeno. La reacción que cataliza es la reducción del nitrato a nitrito en presencia de NADH en hojas y NADPH en raíz. Al fosforilar e inhibir la actividad de la NR, la SnRK1 contribuye a regular el metabolismo del nitrógeno, lo cual puede repercutir en el crecimiento y desarrollo de las plantas [32].
- Trehalosa fosfato sintasa (TPS). Esta enzima se encuentra ligada a la vía de síntesis de la trehalosa. La trehalosa es un disacárido que funciona como molécula involucrada en la señalización de la planta; cuando se afecta su síntesis se alteran procesos de desarrollo y crecimiento.

Otras interacciones importantes durante la respuesta ante el estrés

En cebada la SnRK1 interacciona y fosforila una proteína de choque térmico clase I (HSPI) denominada BHSP17. La expresión de estas proteínas es mas abundante en tejidos periféricos como las raíces y los tallos, por lo que se ha sugerido que la interacción con la SnRK1 puede estar ligada a desencadenar una respuesta que le permita tolerar periodos de sequía [33].

En Arabidopsis se ha observado que las SnRK1 también participan en regular la degradación de proteínas. Las subunidades AKIN10 y AKIN11 interaccionan con una subunidad de las ligasas E3 (Skp1/ASK1), las cuales se encuentran relacionadas en el marcaje de proteínas por ubiquitinación para su posterior degradación en el proteosoma. Además, también interaccionan con

α 4/PAD1 quien es una subunidad del proteosoma 20S [34]. Adicionalmente, se ha observado que blancos putativos de las SnRK1 son proteínas con caja F (F-box), como las E3 ligasas [35], sugiriendo que las SnRK1 pueden regular la degradación de proteínas específicas ya sea como parte del complejo de degradación o fosforilando a las ligasas E3.

Función de la subfamilia de cinasas SnRK2 y SnRK3

SnRK2

Las SnRK2 son cinasas específicas de plantas, se relacionan con la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico y algunos miembros actúan a través de la vía del ácido abscísico (ABA). En Arabidopsis se ha demostrado que la sobreexpresión de estas cinasas confiere tolerancia a la planta ante la falta de agua [36]. La expresión de genes de Arabidopsis que codifican para la cinasa SnRK2 responden a la deficiencia de nitrógeno y fósforo [2]. En maíz, el frío induce la expresión de las cinasas *ZmSnRK2.3*, *ZmSnRK2.7* y mientras que la expresión de *ZmSnRK2.5*, *ZmSnRK2.6* y *ZmSnRK2.9* se reprime por calor [37, 38]. Ciclos de luz-obscuridad regulan la expresión de algunas cinasas como *SnRK2.8* [39], *SnRK2.4* y *SnRK2.1* [40]. Algunos miembros de SnRK2 de arroz se expresan diferencialmente en raíces, hojas y vainas en presencia de ABA, manitol y NaCl. En arroz, el gen *SAPK4* que codifica para una cinasa SnRK2, es fuertemente inducida en altas concentraciones de sal [41].

Los genomas de Arabidopsis y de arroz tienen 10 genes que codifican para SnRK2, las cuales se denominan como *SnRK2.1* hasta *SnRK2.10* y *OsSAK1* a la *OsSAK10*, respectivamente. Estas cinasas se clasifican en tres subgrupos de acuerdo a su respuesta a ABA. Las del grupo 1 no se activan por ABA; las del grupo 2 responden ligeramente a la presencia de ABA, mientras que las del grupo 3 se caracterizan por responder fuertemente a ABA [42].

SnRK2 y estrés osmótico

Se propone que las SnRK2 son reguladores positivos de respuestas al estrés osmótico ya sea aumentando su actividad de cinasa y fosforilando proteínas blanco o bien regulando el nivel de expresión de transcritos importantes en el balance de osmolitos [42, 43, 44]. Las cinasas SPK1 y SPK2 de *Glycine max.* son capaces de fosforilar rápidamente a la proteína que une fosfoinositidos (Ssh1p), lo cual es un evento temprano en la vía de respuesta al estrés hiperosmótico [43, 44].

En arroz, el balance osmótico en el interior de la célula se ve afectado cuando se sobreexpresa la cinasa SAPK4 (quien es una SnK2) y se incrementan los niveles de los transcritos de la H⁺ATPasa y de la catalasa, al mismo tiempo que disminuyen los transcritos del transportador vacuolar Na⁺/H⁺ (OsNH) [41]. Asimismo, la expresión de dos genes que codifican para SnRK2 de trigo, *TaSnRK2.7* [45] y *TaSnRK2.4* [46] en Arabidopsis, le confieren mayor tolerancia ante el estrés osmótico.

Regulación de las cinasas SnRK2 por ABA

Otra de las vías de señalización en donde participan las SnRK's es a través de su interacción con elementos AREBPs (*ABA response elements binding proteins*). Estos elementos son importantes para regular la expresión de genes que responden a ABA y pueden ser fosforilados por las SnRK2. En ausencia de ABA, la autofosforilación de las SnRK2 es contrarrestada por la acción de la fosfatasa PP2C, inhibiendo la actividad de cinasa. En presencia de ABA, proteínas que unen a la hormona actuando como receptores (PYR/PYL/RCAR), incrementan su afinidad por la PP2C y evitan la defosforilación de la SnRK2, lo que permite la fosforilación y activación de las AREBP's para transcribir genes que responden a ABA (Fig. 3) [36].

Tolerancia al estrés salino mediada por SnRK3

Al igual que las SnRK2, la subfamilia de las SnRK3 son específicas de plantas. Las SnRK3 participan en las respuestas por estrés osmótico provocado por concentraciones altas de iones [47]. Las cinasas SnRK3 interactúan con proteínas que unen calcio denominadas CBL (*calcineurin B-*

like), por lo que son consideradas calcio dependientes [48]. El genoma de *Arabidopsis* codifica para 25 SnRK3, siendo esta subfamilia las más abundante de las tres.

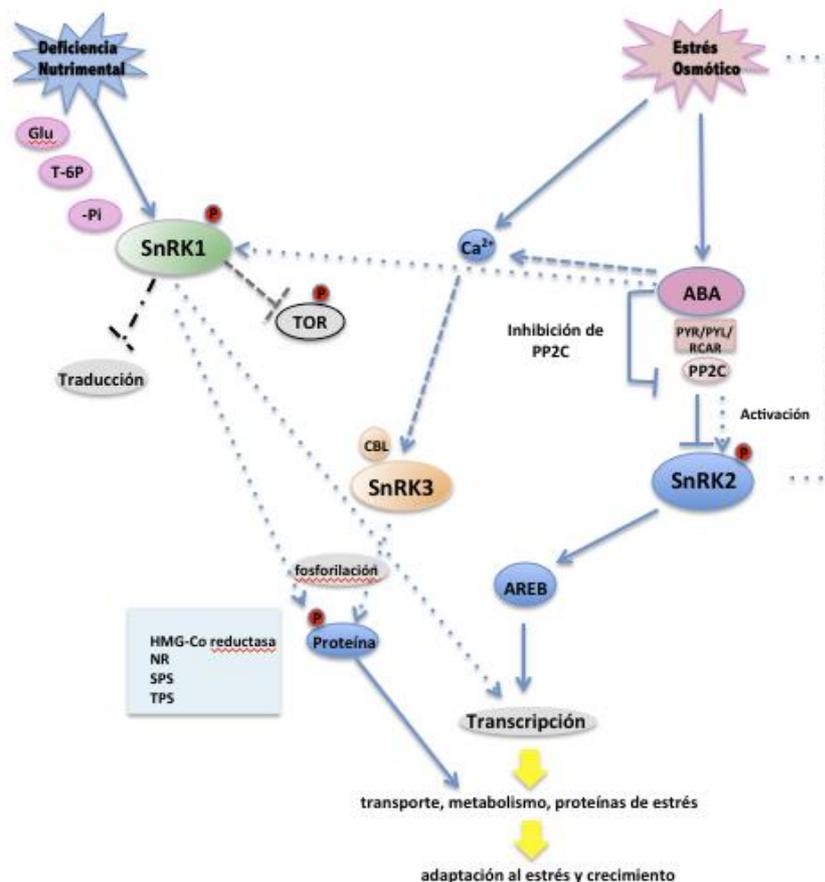


Figura 3. Esquema de participación de las diferentes subfamilias de SnRKs en procesos celulares como respuesta a estrés abiótico

La mayoría de las SnRK3 estudiadas son parte de la vía de señalización SOS (*Salt Overly Sensitive*) que regula la homeostasis iónica. La vía está compuesta por SOS1, un transportador tipo antiporte Na⁺/H⁺ de membrana plasmática, [49], SOS2 quien es una cinasa SnRK3 (también conocida como CIPK) y SOS 3 quien actúa como un sensor de Ca²⁺ tipo CBL. Bajo una condición de estrés por sales, las concentraciones de Ca²⁺ aumentan y son detectadas por SOS3, la cual presenta cambios conformacionales en respuesta a la unión del Ca²⁺ que provocan la activación de SOS2. El complejo SOS2/SOS3 fosforila y activa el transportador SOS1, permitiendo eliminar la sal del interior celular. Los diferentes complejos que se forman entre las SnRK3

(SOS2) y las SOS3, activarán diferentes transportadores y con ello, regularán las concentraciones de iones en diferentes compartimentos (Fig. 3).

En resumen, podemos resaltar que la familia de cinasas SnRK es muy importante en la adaptación de las plantas a diversas condiciones medio ambientales. La subfamilia SnRK1, que ha sido conservada evolutivamente y presenta ortólogos en otros reinos, se ha asociado con la detección del balance energético en respuesta a condiciones nutrimentales desfavorables. En contraste, las subfamilias SnRK2 y SnRK3 son exclusivas de plantas y están íntimamente relacionadas con las adaptaciones metabólicas necesarias para tolerar los cambios climáticos desfavorables dada su condición sésil.

Agradecimientos

PAPIIT IN211513, PAIP 4290-13

Referencias

1. Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., Rolland, F., Winderickx, J. (2011) *FEBS J* **278**, 3978-3990.
2. Coello, P., Hey, S. J., Halford, N. G. (2011) *J. Exp. Bot.* **62**, 883-893.
3. Halford, N. G., Hey, S. (2009) *Biochem J.* **419**, 247-259.
4. Wang, X., Peng, F., Li, M., Yang, L., Li, G. (2012) *J Plant Physiol* **169**, 1173-1182.
5. McKibbin, R. S., Muttucumaru, N., Paul, M. J., Powers, S.J., Burrell, M. M., Coates, S., Purcell, P. C., Tiessen, A., Geigenberger, P., Halford, N. G. (2006) *Plant Biotech J* **4**, 409-418.
6. Baena-Gonzalez, E., Roland, F., Thevelein, J. M., Sheen, J. (2007) *Nature* **448**, 938-942.
7. Fragoso, S., Espínola, L., Páez-Valencia, J., Gamboa, A., Camacho, Y., Martínez-Barajas, E., Coello, P. (2009). *Plant Physiol.* **149**, 1906-1916
8. Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., McKibbin, R., Halford, N. G., Geigenberger, P. (2003) *Plant J* **35**, 490-500.
9. Jossier, M., Bouly, J. P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Hardie, D. G., Thomas, M. (2009) *Plant J* **59**, 316-328.
10. Hey, S. J., Byrne, E., Halford, N. G. (2010) *Annals Bot* **105**, 197-203.
11. Moorhead, G., Douglas, P., Cotelle, V., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A., MacKintosh, C. (1999) Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J.* **18**, 1-12.
12. Robaglia, C., Thomas, M., Meyer, C. (2012) *Curr Opin Plant Biol* **15**, 301-307.
13. Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., Robaglia, C. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 6422-6427.

14. Bradford, K. J., Downie, B., Gee, O. H., Alvarado, V., Yang, H., Dahal, P (2003) *Plant Physiol* **132**, 1560-1576.
15. Radchuk, R., Radchuk, V., Weschke, W., Borisjuk, L., Weber, H. (2006) *Plant Physiol* **140**, 263-278.
16. Zhang, Y., Shewry, P. R., Jones, H., Barcelo, P., Lazzeri, P. A., Halford, N. G. (2001) *Plant J* **28**, 431-441.
17. Lakatos, L., Klein, M., Höfgen, R., Bánfalvi, Z. (1999) *Plant J* **17**, 569-574.
18. Gissot L., Polge C., Bouly JP., Lemaitre T., Kreis M., Thomas M (2004) *Plant Mol Biol* **56**, 747-759.
19. Bouly, J. P., Gissot, L., Lessard, P., Kreis, M., Thomas, M. (1999) *Plant J* **18**, 541-550.
20. Carling, D., Mayer, F. V., Sanders, M. J., Gamblin, S. J. (2011) *Nature Chem Biol* **7**, 512-518.
21. Sugden, C., Crawford, R. M., Halford, N. G., Hardie, D. G. (1999) *Plant J* **19**, 433-439.
22. Lumbreras, V., Albà, M. M., Kleinow, T., Koncz, C., Pagès, M. (2001) *EMBO J* **21**, 55-60.
23. López-Paz C., Vilela, B., Riera, M., Pagès, M., Lumbreras V (2009) *FEBS Letters* **583**, 1887-1894
24. Baena-Gonzalez, E., Sheen, J (2008) *Trends Plant Sci.* **13**, 474-482.
25. Purcell, P. C., Smith, A. M., Halford, N. G. (1998) *Plant J.* **14**, 195-203
26. Lu, C. A., Lin, C. C, Lee, K. W, Huang, L. F, Ho, S. L, Liu, H. J, Hsing, Y. I, Yu, S. M. (2007) *Plant Cell* **19**, 2484-2499.
27. Laurie, S., McKibbin, R. S., Halford, N. G. (2003) *J. Exp. Bot.* **54**, 739-747.
28. Antolín-Llovera, O., Leivar, P., Arró, M., Ferrer, A., Boronat, A., Campos, N. (2011) *Plant Signal. Behav.* **6**, 1127-1131.
29. Bach, T. J. (1995) *Lipids* **30**, 191-202.
30. Chappell, J. (1995) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 521-47.
31. Stermer, B. A., Bianchini, G. M., Korth, K. L. (1994) *J. Lipid Res.* **35**, 1133-40.
32. Price, J., Laxmi, A., StMartin, S. K., Jang, J. C. (2004) *Plant Cell* **16**, 2128-2150
33. Slocombe, S. P., Beaudoin, F., Donaghy, P.G., Hardie, D. G., Dickinson, J. R., Halford, N. G. (2004) *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 111-116
34. Farrás, R., Ferrando, A., Jaasik, J., Kleinow, T., Ocre, L., Tiburcio, A., Salchert, K., del Pozo, C., Schell, J., Koncz, C. (2001) *EMBO J.* **20**, 2742-2756.
35. Vlad, F., Turk, B. E., Peynot, P., Leung, J., Merlot, S. (2008) *Plant J.* **55**, 104-117
36. Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17306-17311.
37. Huai, J., Wang, M., He, J., Zheng, J., Dong, Z., Lv, H., Zhao J, Wang G (2008) *Plant Cell Rep.* **12**, 1861-1868.
38. Zou, H., Zhang, X., Zhao, J.R., Yang, Q., Wu, Z., Wang, F., (2006) *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 490-496.
39. Shin, R., Alvarez, S., Burch, A. Y., Jez, J. M., Schachtman, D. P. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6460-6465.
40. Park, Y. S., Hong, S. W., Oh, S. A., Kwak, J. M., Lee, H. H., Nam, H. G. (1993). Two putative protein kinase from *Arabidopsis thaliana* contain highly

- acidic domains. *Plant Mol. Biol.* **22**, 615–624.
41. Diedhiou, C. J., Popova, O. V., Dietz, K-J., Golldack, D. (2008) *BMC Plant Biol.* **8**, 49.
42. Kulik, A., Wawer, I., Krzywinska, E., Bucholc, M., Dobrowolska, G. (2011) *J. Integrat. Plant Biol.* **15**, 859-872
43. Kearns, M. A., Monks, D. E., Fang, M., Rivas, M. P., Courtney, P. D., Chen, J., Prestwich, G. D., Theibert, A. B., Dewey, R. E., Bankaitis, V. A. (1998) *EMBO J.* **17**, 4004–4017.
44. Monks, D. E., Aghoram, K., Courtney, P. D., De Wald, D. B., Dewey, R. E. (2001) *Plant Cell* **13**, 1205–1219.
45. Zhang, H., Mao, X., Jing, R., Chang, X., Xie, H. (2011) *J. Exp. Botany* **62**, 975–988.
46. Mao, X., Zhang, H., Tian, S., Chang, X., Jing, R. (2010) *J. Exp. Botany* **61**, 683–696.
47. Liu, J., Zhu, J. K. (1998) *Science* **280**, 1943–1945.
48. Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., Zhu, J. K. (2001) *Plant Cell* **13**, 1383–1399.
49. Zhu, J. K. (2003) *Curr. Op. Plant Biol.* **6**, 441–445.

Semblanza de la Dra. Martha Patricia Coello Coutino



Es bióloga de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realicé un posgrado en Ciencias Químicas (Bioquímica) en la Facultad de Química de la UNAM. La estancia postdoctoral la realicé en la Universidad de Columbia-Missouri, USA trabajando con mecanismos de transducción de señales y respuesta de las plantas a estreses nutricionales. Soy Profesor Titular en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química. Pertenezco al Sistema Nacional de Investigadores Nivel I y PRIDE C. El proyecto que actualmente desarrollamos en el grupo intenta dilucidar los mecanismos de transducción de señales en respuesta a estreses abióticos en las plantas.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 292 – 311, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.

(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

APUNTES SOBRE GENÓMICA

GENOMIC NOTES

Víctor Valdés López, Luisa Alba Lois, Claudia Segal Kischinevzky, Aristides Ill Sampieri Hernández, Joel Corona Pacheco y Alfonso Vilchis Peluyera.

Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, CP 04510, México, DF.
vvaldes@unam.mx

Resumen

Desde que quedó establecido que la información genética de los sistemas biológicos se almacena en la forma de grandes moléculas de DNA que constituyen los genomas, se inició la búsqueda para desarrollar metodologías que permitieran analizar las secuencias y comprender la estructura, regulación, funcionamiento, interacciones y evolución de los genes y genomas. Inicialmente, la secuenciación se limitaba a establecer el orden de genes individuales. Con la llegada de técnicas de secuenciación masiva, fue posible iniciar la secuenciación de genomas completos. Ambos aspectos se complementan en el sentido de que el genoma completo permite tener una visión global, que se integra con la información derivada de genes particulares.

Palabras clave: Genoma procarionte, genoma eucarionte, anotación génica, evolución molecular.

Abstract

Since the times in which it was established that the genetic information in all the biological systems is contained in big DNA molecules, which conforms the genomes, a series of efforts were carried on in order to obtain the DNA sequences in an attempt to understand the structure, regulation, performance, interactions and evolution of genes and genomes. At the start, sequence protocols were limited in scope and it was only feasible to obtain the sequence of individual genes. However, with the development of massive sequence methodologies, it was possible to obtain the complete genome sequences. Both strategies are complementary in the sense that the complete genome allows having a global view that supplements the information derived from specific genes.

Keywords: Prokaryotic genome, eukaryotic genome, genome annotation, molecular evolution.

Introducción

A partir de que Darwin postuló su teoría de evolución por medio de la selección natural, quedó claro que la base de esta selección se fundamenta en la variabilidad genética presente en organismos y poblaciones [1]. Aunque no conoció los trabajos de Mendel, queda claro que Darwin concebía que los procesos evolutivos debieran tener una base genética -aunque no usara estos términos-. El redescubrimiento de las leyes de Mendel a principios del siglo pasado, permitió integrar ambos conceptos en el llamado “neo-darwinismo”. Sin embargo, si bien surgieron conceptos relevantes como genotipo y fenotipo, aún se estaba lejos de lograr establecer de qué clase de compuesto estaban hechos los genes y de concretar las bases moleculares de la mutación. Inclusive de aquella época nos llega la idea de “los efectos nocivos de la mutación”. Hoy entendemos que si bien puede haber mutaciones con efectos deletéreos, en realidad sin mutación no habría evolución. Dicho de otro modo, la mutación es la materia prima de la evolución. Sólo gracias a ella se han desarrollado en este planeta, durante más de 3,500 millones de años toda la pléyade de organismos que conocemos, ya

sean contemporáneos o extintos (que son la mayoría). Entre 1944 y 1952, se demostró que la molécula responsable de determinar los caracteres hereditarios es el DNA, aunque hoy sabemos que también hay genomas de RNA [2]. La propuesta de Watson y Crick para la estructura tridimensional de la molécula del DNA dio con el concepto clave que une las ideas de Darwin y la genética [3]. La llamada doble hélice permite comprender cómo es que los genes llevan a cabo sus diversas funciones. Por un lado, explica la dimensión vertical en la que la información pasa de generación en generación. Pero también, en función de que la copia de la información genética no es perfecta y ocurren mutaciones, permite comprender cómo estos cambios acumulados a lo largo de muchas generaciones derivan en cambios que originan nuevas especies. Este es uno de los conceptos centrales de Darwin. Tampoco hay que olvidar, que los mismos Watson y Crick, propusieron que en la secuencia de nucleótidos existe un cifrado que permite la síntesis de secuencias específicas de residuos de aminoácidos que constituyen las proteínas [4]. Dicho de otro modo, el modelo de la doble hélice permite conectar las relaciones entre genotipo – fenotipo / filogenia – ontogenia / genoma - proteoma.

La propuesta de Watson y Crick llevó a diversos grupos de investigación a dilucidar las bases de los procesos fundamentales que ocurren a nivel molecular en los sistemas biológicos. Así, se establecieron de manera general los mecanismos de replicación, transcripción, traducción, regulación de la expresión génica y por supuesto se estableció el código genético. Al irse aclarando estos procesos, quedó claro que la propuesta del modelo, que originalmente era teórica, explicaba dichos procesos. Sin embargo quedaba una laguna por cubrirse: poder determinar la secuencia de nucleótidos de los genes. A mediados del siglo XX no existían estrategias ni metodologías que permitieran lograr este propósito. De hecho, ante esta limitante, Fred Sanger desarrolló los métodos clásicos de secuenciación de proteínas. Se puede decir que si no podían secuenciar a los ácidos nucleicos, al secuenciar aminoácidos por lo menos estaban obteniendo la

información de segunda mano. Por supuesto estas estrategias de Sanger fueron revolucionarias, pero aún no se podían secuenciar los genes de manera directa con rapidez, eficiencia, confiabilidad y a bajo costo. Finalmente, a finales de los años 70 del siglo pasado, el mismo Sanger publicó los métodos y estrategias que permitieron que la biología molecular transitara de su etapa clásica de la doble hélice, a la era del gen y la genómica [5, 6].

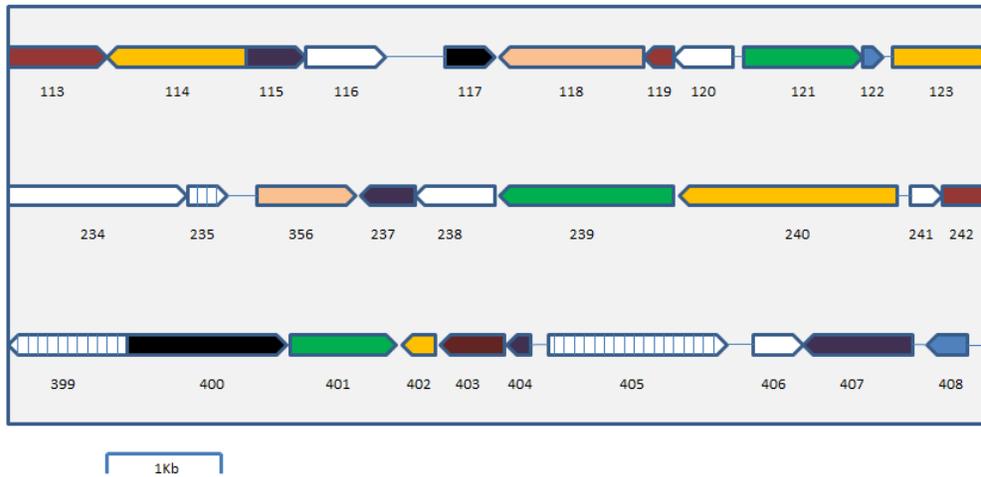
Secuencias

Independientemente del conocimiento de la secuencia de genes y genomas, existen algunos aspectos básicos que distinguen a los diferentes sistemas biológicos. Uno que es fundamental, es que el tamaño de los genomas se incrementa proporcionalmente con la complejidad morfológica, fisiológica y metabólica de los organismos. Sin embargo, aunque también se aprecia un aumento en el número de genes, éste no es equivalente. Por ejemplo, entre *Escherichia coli* y *Homo sapiens*, el aumento del tamaño del genoma es de tres órdenes de magnitud (4.6 megabases vs. 3,000 megabases), mientras que el aumento en el número de genes es de sólo cinco veces aproximadamente (4,500 vs. 20,687) [7, 8]. Así, en apariencia parece haber un exceso de nucleótidos en el genoma humano. Si bien estas diferencias presentan rangos en diferentes organismos, existe un patrón bastante claro, particularmente entre procariontes y eucariontes. A esta discrepancia se le ha llamado “la paradoja del valor C”, donde C significa cantidad de nucleótidos. Esta aparente paradoja se explica por dos motivos principalmente. El primero es que en sistemas procariontes, el espacio entre los genes (DNA espaciador o intercistrónico), es muy pequeño, mientras que en eucariontes este DNA intercistrónico puede ocupar millones de pares de bases. Adicionalmente, en general los genes procariontes son una secuencia continua entre el codón de inicio y el codón de término. Por su lado, genes homólogos de eucariontes, que inclusive codifican cadenas polipeptídicas de tamaños similares, presentan secuencias intergénicas (intrones), que se encuentran entre las secuencias codificantes (exones), que serán unidas (empalmadas), para generar a

los RNA's mensajeros eliminándose a los intrones. En términos generales, la proporción de nucleótidos de los intrones y los exones es de 10:1. Como consecuencia de los anteriores, en el genoma humano la cantidad de DNA codificante es de sólo 2% [9]. Lo anterior ha sido expresado en el sentido de que la densidad génica de los genomas procariontes es alta (más genes por megabase), mientras que la densidad génica del genoma eucarionte es baja (menos genes por megabase). En la figura 1 se esquematizan estas diferencias.

El producto directo de la secuenciación de genes y genomas es la obtención del ordenamiento de nucleótidos. De manera directa, el primer análisis que se puede hacer, es determinar la proporción de cada una de las diferentes bases (A, T, G, C), lo cual es una característica específica de cada genoma. Ésta es la llamada relación de asimetría propuesta por Erwin Chargaff ($A+T / G+C \neq 1$) [10] y de alguna manera refleja la secuencia específica de cada genoma. Por ejemplo, en el humano esta es una relación de 1.52 y significa que nuestro genoma contiene una mayor proporción de AT que de GC, mientras que en *Brucella abortus* la relación es de 0.72. La relación de simetría de Chargaff ($A/T=1$ $G/C= 1$, o lo que es lo mismo $A+G / T+C = 1$) fue la base de la propuesta de Watson y Crick para proponer que en la doble hélice se dan apareamientos complementarios de nucleótidos. Por su lado, la relación de asimetría, que es una constante especie específica, les permitió considerar que ésta refleja el contenido informacional de la especie. Dicho de otro modo, la secuencia de pares de bases en los genomas está bajo presión de selección que determina en última instancia la secuencia de residuos de aminoácidos de las proteínas, *i. e.*, la composición de bases de los genomas no es al azar.

A



B

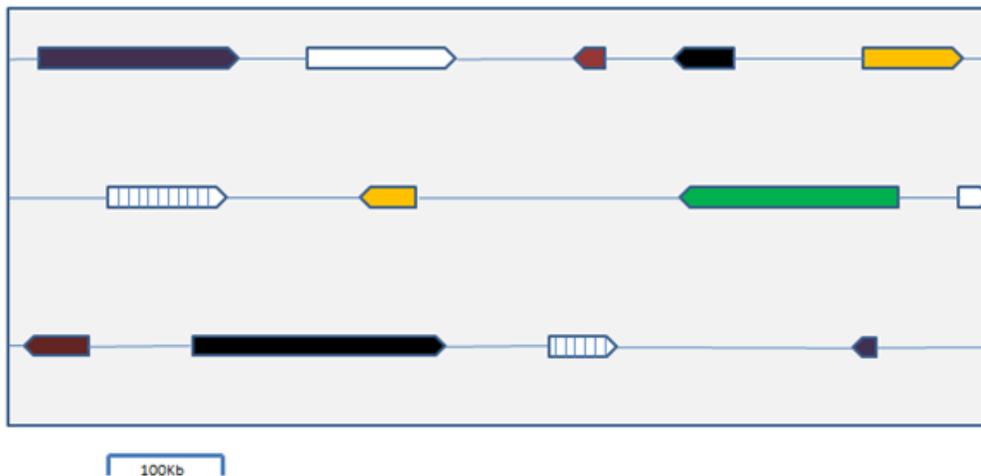


Figura 1. Representación simplificada comparativa del mapa físico-genético de un genoma procarionte (A) y un genoma eucarionte (B). En ambos casos se muestra una representación lineal, aunque en procariontes el genoma es circular. Nótese que la escala es diferente (mil pares de bases en el procarionte y cien mil pares de bases en el eucarionte). Por esta razón, la densidad génica del mapa procarionte es alta, mientras que en el genoma eucarionte existen grandes cantidades de DNA intergénico. Cada flecha representa un gen y la orientación indica la dirección de la transcripción. En procariontes los genes son comparativamente pequeños, mientras que en eucariontes, por la presencia de los intrones, los genes tienden a ser más grandes; si bien una vez que se empalman los exones, la longitud de las secuencias codificantes es similar. Los colores pretenden representar categorías funcionales de los genes, por ejemplo, metabolismo, síntesis de

DNA, replicación, proteínas de membrana (señaladas con barras verticales), etc. Las flechas en blanco indican que se desconoce la función de ese gen.

Sin embargo, la secuencia de nucleótidos en sí, necesita ser analizada para obtener la información relevante. A este proceso se le denomina anotación. De manera resumida, un primer paso consiste en determinar si alguna secuencia tiene posibilidades de ser codificante [7]. En este sentido, es necesario encontrar al marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés), que tenga las mayores posibilidades de ser codificante. De manera sencilla, un ORF está delimitado por un posible codón de inicio (frecuentemente ATG) y alguno de los tres posibles codones de término (TAA, TAG, TGA). Empleamos aquí una terminología laxa de codón ya que en sentido estricto los codones ocurren a nivel de RNA y por lo tanto aparece uracilo (U) en vez de timina (T). Sin embargo, como se ve en la figura 2A, el número de estos tripletes es considerable. Esto se debe a dos razones: En cualquier secuencia de nucleótidos hay tres posibles fases de lectura (en realidad son seis si se consideran las dos cadenas del DNA), de tal manera que los tripletes no necesariamente corresponden a codones porque pueden estar en las fases incorrectas. Por el otro lado, aún en la fase de lectura correcta, ATG puede corresponder a codones internos de metionina. De hecho, un análisis de la secuencia en la figura 2A, debe mostrar que existen muchos ORFs de tamaño variable. Existen varios criterios para establecer cuál de estos tiene una mayor probabilidad de ser codificante [11]. Uno de los más sencillos es el tamaño. Este criterio se basa en que los ORFs en una secuencia al azar deben de ser cortos (alrededor de 21 tripletes), mientras que los ORFs codificantes deben de ser de mayor tamaño, ya que la mayor parte de las proteínas contienen 100 o más residuos de aminoácidos. Si bien este no es un criterio único, dado que existen polipéptidos de menos de 30 residuos, éstos son los menos. Otro criterio utilizado se basa en la frecuencia de uso de codones sinónimos, que normalmente es una característica particular de cada especie. En la figura 2B, se indica cuál es el marco de lectura abierto de mayor probabilidad. Una vez ubicado, como se muestra en la figura 2C, el siguiente paso es derivar la secuencia probable de

residuos de aminoácido codificada por dicho ORF. Actualmente, otra opción, dado el gran crecimiento de las bases de datos, es llevar a cabo una búsqueda bioinformática para encontrar secuencias homólogas a la de interés [12]. Esta opción complementa los pasos anteriores. Evidentemente, en este ejemplo sencillo no se está considerando la presencia de intrones, lo cual desde luego requiere de procesos más sofisticados para su identificación.

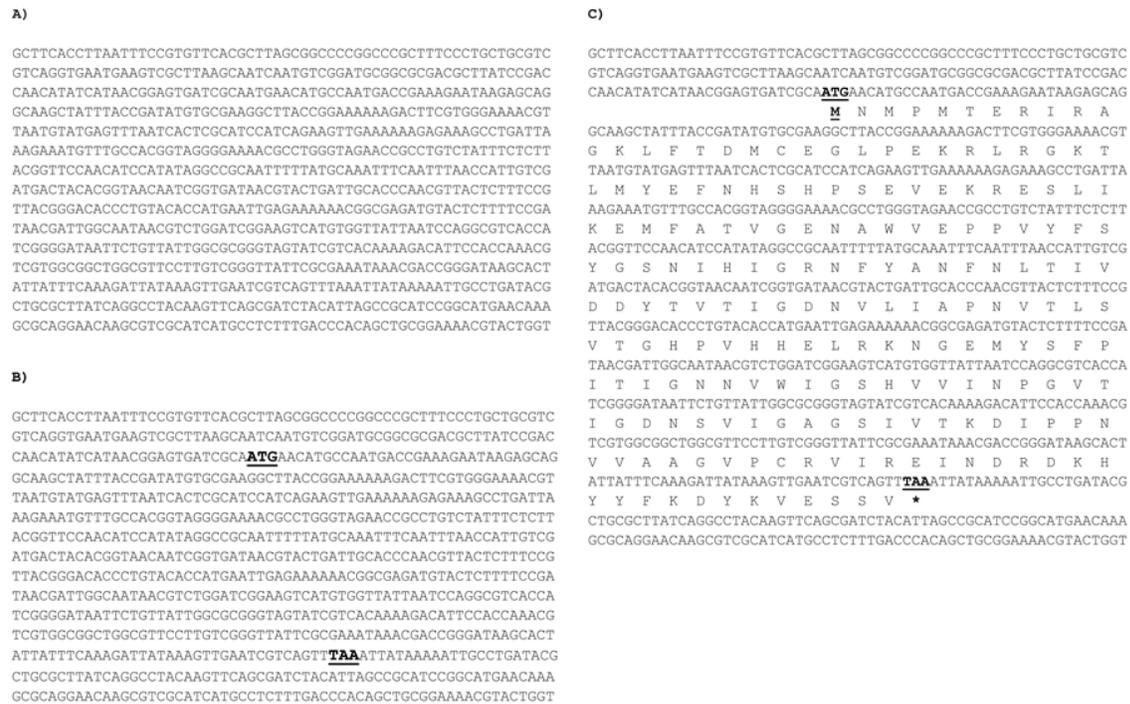


Figura 2. Esquema secuencial de anotación de una secuencia codificante. A, secuencia directa. B, delimitación del marco de lectura abierta (ORF) de mayor potencialidad. C, derivación de la secuencia probable de residuos de aminoácidos del ORF.

Genoma procarionte

Partiendo de las técnicas de secuenciación de Sanger, durante varios años se secuenciaron muchos genes individuales representativos de diferentes organismos en el árbol filogenético. Sin embargo, aunque la secuenciación masiva de genomas vendría después, el primer genoma totalmente secuenciado por el grupo de Sanger fue el del bacteriófago φ-X174. Éste es un pequeño genoma de tan sólo 5,375 nucleótidos, lo cual evidentemente era una ventaja. En este caso se

aprovechó el hecho de que varios de los productos polipeptídicos habían sido secuenciados y se podía usar su secuencia para corroborar la anotación del genoma. Cada genoma presenta particularidades y sorpresas. En el caso de este bacteriófago, se estableció que varios de sus genes están sobrelapados debido a que se traducen en dos diferentes fases de lectura [13]. Poco a poco se fueron secuenciando más genomas pequeños, como los mitocondriales, de cloroplastos y varios bacteriófagos. Eventualmente, en 1995 el grupo de Venter, reportó el genoma de *Haemophilus influenzae* con un tamaño de 1'830,137 pares de bases, y se convirtió en el primer genoma celular completo en ser secuenciado [14]. A partir de esa fecha la cantidad de genomas procariontes y eucariontes secuenciados ha tenido un impresionante incremento.

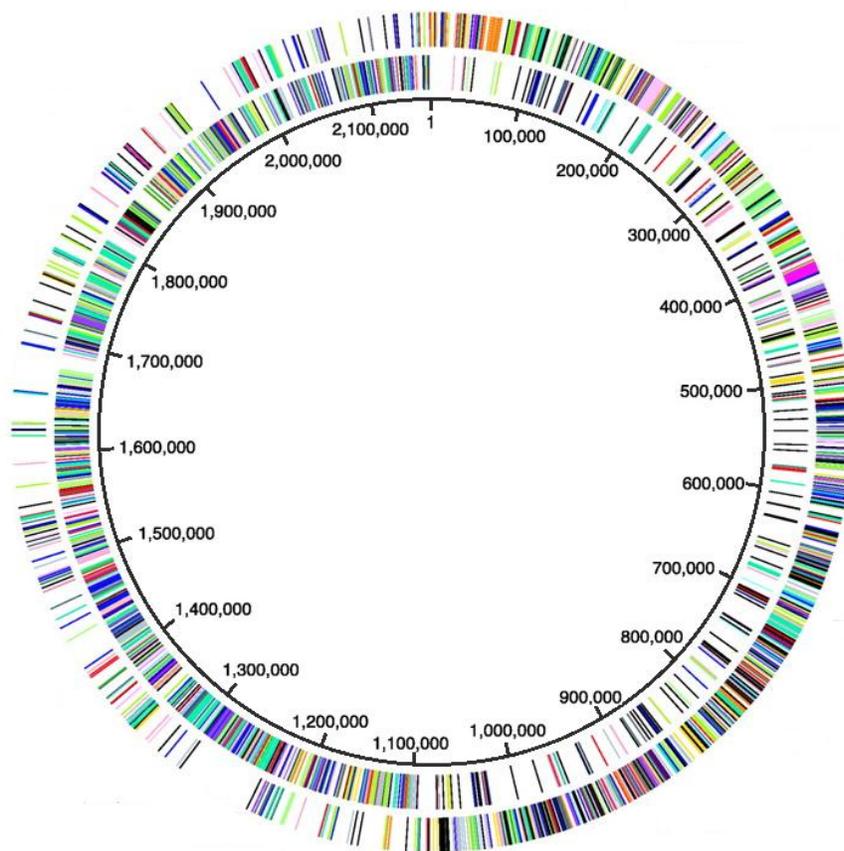


Figura 3. Representación esquemática de un genoma procarionte. Los círculos concéntricos indican la ubicación de los genes en cada una de las cadenas.

En la figura 3 se muestra de manera esquemática un ejemplo de un mapa físico genético de tipo procarionte. Dentro de las características generales que se pueden destacar, se pueden mencionar las siguientes. En general, aunque hay excepciones, los genomas procariontes están constituidos por una sola molécula circular de DNA. En ésta se ubican los genes, que en la figura 3 están indicados por las barras de los dos círculos concéntricos. Habitualmente, los colores se refieren a una clasificación funcional global, *i. e.*, aunque cada gen tiene una función particular, éstos participan en procesos generales. Por ejemplo, replicación, transcripción, metabolismo de aminoácidos, etc. En este sentido, se puede apreciar que los genes que participan en procesos específicos, no se encuentran agrupados en regiones específicas del genoma, sino que se encuentran dispersos. Lo anterior no se contrapone con el hecho de que algunos genes están agrupados en operones. Comparativamente, dos genomas pueden tener genes similares, pero el orden de estos puede ser diferente y posiblemente esto tenga implicaciones regulatorias o evolutivas [7]. No todos los ORFs identificados se pueden asociar a una función determinada y por lo tanto corresponden a genes cuya función aún está por esclarecerse. Como quedó indicado antes, los genes procariontes no tienen interrupciones intragénicas y tampoco existen grandes cantidades de DNA espaciador, por lo que la densidad génica es alta (ver figura 1). Un análisis de los genes individuales, muestra que son de tamaño variable. Sin embargo se puede notar una fuerte tendencia a que el tamaño de los ORFs sea de 1,000 pares de bases. Dicho de otro modo, los polipéptidos codificados tendrán en promedio 333 residuos de aminoácidos. Comparativamente, aunque los genes eucariontes son considerablemente mayores por la presencia de intrones, al quedar empalmado el mRNA maduro el tamaño medio de los polipéptidos es de un tamaño similar.

En la figura 3, los dos círculos concéntricos representan a las dos posibles direcciones transcripcionales (Ver figura 1). Esto significa que algunos genes se copian a partir de una de las cadenas del DNA y otros de la complementaria. Esta

polaridad está determinada por los promotores individuales. Habitualmente, el mapa genómico se ordena a partir del sitio de origen de la replicación y a partir de ahí se inicia la numeración de los nucleótidos. Así, convencionalmente, las coordenadas genómicas parten del sitio de origen de la replicación y dado que ésta va a proceder de manera bidireccional, a una cadena se le denomina positiva (líder) y a la otra negativa (retrasada), en referencia al avance de las horquillas de replicación. Cuando el genoma se replica, este proceso termina aproximadamente en el lugar opuesto al sitio de origen, lo cual le da al genoma una división simétrica respecto a este proceso. Desde hace tiempo se notó que existe una asimetría en la dirección transcripcional, en el sentido de que un mayor número de genes se transcriben en la misma dirección global del proceso de replicación en cada una de las dos mitades del genoma. La hipótesis más simple es que si la replicación y la transcripción proceden al mismo tiempo, pero en direcciones opuestas, se darían “choques” entre la DNA polimerasa y la RNA polimerasa [15] y la asimetría dependería simplemente del nivel de expresión de los genes, de tal manera que aquellos con mayor nivel de transcripción lo harían en la dirección global de la replicación. Una hipótesis alternativa propone que los genes que se transcriben en la misma dirección que la replicación corresponden a genes “esenciales” para la supervivencia del organismo, si bien no es sencillo definir qué significa que un gen sea esencial [16]. Las predicciones y resultados de ambas propuestas siguen debatiéndose. Recientemente, hemos llevado a cabo un análisis comparativo de cinco genomas bacterianos, el cual indica que sólo un bajo porcentaje (2.06 %) de genes en común se encuentran en la cadena líder en todos estos genomas, lo cual sugiere que las causas de la asimetría transcripcional son inherentes a los genomas y no se deben al nivel de expresión o a la esencialidad de genes individuales [17].

La comparación de genomas tanto procariontes como eucariontes, muestra que son pocos los genes que se encuentran en uno solo de ellos. Dicho de otro modo, genes homólogos pueden aparecer en varios genomas, lo cual no significa

que muchos genes aparecen en la mayoría de los genomas. De hecho, el número de genes “universales” es bajo. Las implicaciones evolutivas, metabólicas y regulatorias de esto aún están por esclarecerse.

Genoma eucarionte

A diferencia del genoma procarionte, en eucariontes el genoma está dividido en varias moléculas lineares de DNA que propiamente se denominan cromosomas (cuerpos coloridos que se visualizan durante la división celular). El número específico de cromosomas presenta una gran variabilidad y no existe una clara correlación con el tamaño del genoma ya que especies con genomas de tamaño similar pueden tener una diferencia importante en el número de cromosomas.

Hoy contamos con las secuencias reportadas de un buen número de genomas eucariontes, aunque han sido muchos los enfoques experimentales que se han utilizado para esclarecer algunas de sus características, particularmente el del humano. En términos generales, los eucariontes presentamos tres clases de secuencias de acuerdo con su frecuencia: secuencias altamente repetitivas, moderadamente repetitivas y secuencias no repetitivas [9]. Aunque la división no es tajante, de manera general a cada clase le corresponden determinados elementos. Una característica de las secuencias altamente repetitivas es que se encuentran en elementos “estructurales” como los centrómeros y los telómeros. Como particularidad, estas secuencias no se transcriben y tienen una localización perfectamente delimitada. Además de las anteriores, existen secuencias repetitivas interdispersas, *i. e.*, se encuentran a todo lo largo de los cromosomas y en conjunto pueden constituir hasta el 45% del total del genoma humano [9]. Dentro de éstas, las más abundantes son los elementos interdispersos largos (LINE, long interspersed elements) y los elementos interdispersos cortos (SINE, short interspersed elements). En ambos casos el número de copias es de cerca de un millón. Sin embargo su característica más notable es que su propagación por el

genoma es mediado por eventos de transcripción y retrotranscripción. En particular las LINEs, contienen un ORF que codifica a la transcriptasa reversa.

La mayor parte de nuestros genes se encuentra en la fracción de DNA no repetitiva, pero algunos de nuestros genes se encuentran en la fracción moderadamente repetitiva, abarcando alrededor de 300 a 500 copias. A estos genes se les denomina genes amplificados y los ejemplos clásicos corresponden a los genes que codifican a los diferentes RNAs ribosomales y de transferencia. La necesidad de copias múltiples de estos genes se deriva del hecho de que una vez que se transcriben, ya no se traducen, a diferencia de lo que pasa con los genes que codifican RNAs mensajeros que serán traducidos muchas veces. También, se encuentran en nuestro genoma secuencias no repetitivas cuya función aún no ha sido esclarecida. En la tabla I se presenta el porcentaje aproximado de DNA ocupado por las distintas clases. Es evidente que la baja densidad génica se deriva principalmente del DNA intergénico ya sea repetitivo o no, y la longitud de nuestros genes se alarga debido a la presencia de los intrones [9].

Secuencias repetitivas	48 %
Secuencias no repetitivas	30 %
Intrones	20 %
Exones	2 %

Otros elementos que aparecen en nuestro genoma son producto de procesos evolutivos complejos. Estos son los pseudogenes y retropseudogenes [18]. Los primeros se originan por la misma razón que ha determinado la divergencia evolutiva de los genes homólogos en el transcurso del tiempo: la mutación. Tal y como Darwin lo conceptualizó, la variabilidad evolutiva procede de fenómenos totalmente al azar. Nadie dirige la evolución y en este sentido en el genoma, la molécula de DNA sufre cambios que denominamos mutaciones. En su sentido más sencillo la mutación puede ser simplemente el cambio de una base por otra o la inserción o deleción de varios nucleótidos (ya sean múltiplos de tres o

no). Algunas mutaciones pueden no tener impacto ni en la proteína codificada ni en su regulación, por lo que tendrían un efecto neutro. Otras, pueden tener un impacto en el sentido de que generen cambios que tengan algún efecto específico. Un ejemplo podría ser en la capacidad catalítica de una enzima o su nivel de expresión. Estos cambios son sujetos de selección natural y si ocurren en el momento en que permiten que el individuo portador de la mutación tenga más posibilidades de reproducirse, el cambio tenderá a fijarse en la población y por lo tanto tiene un efecto evolutivo positivo.

Sin embargo, dado que los cambios ocurren al azar, también se puede dar el caso de que la mutación afecte de manera dramática y desfavorable al gen que la recibe. El resultado directo es la aparición de un pseudogen que ha perdido su función. La mutación puede afectar cualquier región. Por ejemplo, un cambio que elimine el codón de inicio, introduzca un codón de término prematuro, o que afecte el codón de un aminoácido esencial por otro. También puede haber cambios que afecten las regiones regulatorias y por supuesto, inserciones y deleciones que no sean múltiplos de tres, correrían el marco de lectura, generando polipéptidos no funcionales. Desde un punto de vista ingenuo, parecería que los pseudogenes son eventos muy poco favorables y por lo tanto no deberían ocurrir frecuentemente. Sin embargo, los caminos de la selección natural son más complejos y en este caso particular es notable que los pseudogenes (y retropseudogenes) sean elementos comunes en nuestro genoma [19]. Inclusive, hay casos donde la pseudogenización puede asociarse a ventajas evolutivas. Los pseudogenes se identifican por tener una suficiente identidad con genes homólogos (ya sean ortólogos o parálogos), y conservan la estructura global del gen original, *i. e.*, tienen regiones equivalentes a los exones, los intrones y al promotor.

Por su parte, los retropseudogenes no tienen estas características. A estos elementos también se les denomina pseudogenes procesados [18]. Como quedó indicado anteriormente, las secuencias LINEs tienen capacidad de codificar una

transcriptasa reversa, la cual normalmente retrotranscribe los transcritos de las secuencias LINE. Sin embargo, de manera accidental y ocasional, la transcriptasa reversa puede utilizar como sustrato el mRNA maduro (sin intrones) de uno de nuestros propios genes y reinsertarlo en nuestro genoma como una retrocopia. De manera formal, inicialmente la secuencia correspondiente a la región codificante puede ser una copia fiel de la original. Sin embargo, dado que los elementos regulatorios como los promotores no se transcriben, la retrocopia carecerá de la capacidad de expresarse y por lo tanto comenzará a acumular mutaciones a lo largo del tiempo. En ambas clases de pseudogenes la acumulación de mutaciones es un proceso gradual que no depende de presiones de selección. En este sentido, el porcentaje de identidad con la secuencia inicial puede ser usada como un reloj que permite determinar hace cuántos millones de años que se originó el pseudogen.

Pero además, en el caso de los retropseudogenes, el número de copias de genes particulares puede ser un reflejo del nivel de expresión del gen debido a que si el número de copias de sus mRNAs es alto, tendrá una mayor posibilidad de ser retrotranscrito, a diferencia de un gen que tiene un bajo nivel de transcripción [20]. En varios sentidos, los pseudogenes procesados y no procesados están comenzando a aparecer como elementos complejos que pueden inclusive estar involucrados en la regulación de genes parálogos a ellos.

El proyecto ENCODE y el genoma humano

El Proyecto ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements), comenzado en el año 2007, se propuso identificar todos los elementos funcionales codificados en el genoma humano [8]. Por elemento funcional se entiende un segmento discreto del genoma que codifica un producto particular – proteína o RNA no codificante -, o que tiene una característica bioquímica dada, como por ejemplo, una secuencia de unión a proteína o una estructura específica de cromatina. Este proyecto surgió como una derivación directa de la secuenciación del genoma humano, de su

anotación inicial y la identificación de genes, pseudogenes, retropseudogenes, secuencias repetitivas, etc. Cabe mencionar que una de las sorpresas más espectaculares que resultaron del análisis del genoma humano, fue el hecho de encontrar un número mucho menor de genes del que se había esperado; algunos cálculos iniciales postulaban entre 70,000 y 100,000 genes en nuestro genoma. Actualmente, se han identificado aproximadamente 20,687 genes codificantes para proteínas [8]. Como se mencionó anteriormente, las secuencias codificantes (exones), solamente representan el 2% y es por esta razón, por lo que durante varias décadas se habló de que la mayor parte del genoma humano consistía de “basura”, es decir, de una inmensa cantidad de DNA sin función que había ido almacenándose a través del tiempo; entre este DNA sin función también se incluían los pseudogenes y los retropseudogenes, copias no funcionales de genes. De manera paralela, durante las décadas de 1970 – 1980 se habían identificado elementos genómicos como retrotransposones, los cuales, aunque no codificaban productos proteicos con una función fenotípica, sí poseían la capacidad de multiplicarse en el interior del genoma, y por esta razón se denominó al conjunto de estas secuencias como “selfish DNA” o “DNA egoísta” [21]. Desde luego, este “DNA egoísta” era parte de la “basura genómica”. Esta visión del genoma humano aún permanecía vigente cuando se publicó la secuencia en el año 2001.

¿Cuáles fueron los principales retos en la anotación del genoma humano? La identificación de ORFs y su posterior validación como secuencias codificantes fue de la mano con la búsqueda bioinformática de genes homólogos ya reportados y cuyas secuencias figuraban en la bases de datos Genbank operada por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) en Estados Unidos. Así, el reto principal consistió en la identificación de genes - ya fueran codificantes para proteína o para RNA no codificante (RNAnc) -.

En el genoma humano, se encuentran varios tipos de RNA no codificante:
1) RNAs de transferencia, 2) RNAs ribosomales, 3) RNAs nucleolares pequeños,

4) RNAs nucleares pequeños, entre los que se encuentran RNAs de interferencia y 5) RNAs con diversas funciones tales como el RNA de la telomerasa, el RNA 7SL de la partícula de reconocimiento de señal y el RNA del transcrito Xist, implicado en el efecto de compensación de dosis por inactivación del cromosoma X. Debido a que estos tipos de RNAs no contienen ORFs, son pequeños y no son poliadenilados, las técnicas computacionales clásicas para la identificación de ORFs no funcionan en este caso, por lo que su detección en la anotación inicial del genoma humano se basó principalmente en la búsqueda de secuencias de RNAs homólogas en otros organismos, utilizando principalmente el algoritmo BLASTn [9]. Inicialmente, se identificaron aproximadamente 700 secuencias expresadas como RNAs, aunque en varios casos su función era desconocida. Todos los datos anteriores parecían confirmar la visión clásica del contenido de información fenotípica del genoma humano: solamente un 2% del total de los 3×10^9 pares de bases mostraban una función codificante, fuera en forma de proteína - vía RNA mensajero - o de RNAs.

La publicación de los resultados del proyecto ENCODE en septiembre del año 2012 cambió radicalmente la visión “clásica” que se tenía del genoma humano: utilizando diferentes técnicas para el aislamiento de RNAs de diversas líneas celulares, se encontraron 8,801 RNAs no codificantes menores de 200 nucleótidos y 9,640 RNAs no codificantes con una longitud de más de 200 nucleótidos [8]. Un dato muy importante consiste en que el 29% de estos RNAs se expresan en un tipo de célula pero no en otro, mientras que sólo el 10% son expresados en todas las líneas celulares analizadas [22]. En general, su papel funcional aún se desconoce.

Uno de los resultados más relevantes derivado del proyecto ENCODE se relaciona con los elementos regulatorios a nivel de secuencia: promotores, potenciadores transcripcionales (enhancers), aisladores (insulators), silenciadores (silencers), sitios de metilación del DNA, modificaciones de histonas y regiones de

control de locus. Mediante ensayos para detectar sitios hipersensibles a la Dnasa I, es decir, lugares de remodelación de la cromatina en que por desplazamiento de nucleosomas la secuencia de DNA es expuesta (cromatina abierta) y capaz de interactuar con proteínas regulatorias, se identificaron aproximadamente 2.9 millones de éstos en 125 tipos celulares distintos; mediante correlaciones entre sitios hipersensibles a la Dnasa I y promotores cercanos activos, se pudieron ubicar más de 500,000 sitios con posible función de potenciadores con sus probables genes blanco, así como su interacción con factores transcripcionales [23, 24]. Este estudio también demostró que en algunas regiones genómicas con posible función de potenciador existe actividad transcripcional, es decir, la RNA polimerasa II genera transcritos asociados a potenciadores denominados eRNA (enhancer RNA) [22, 25]. Este reciente descubrimiento añade un nivel mayor de complejidad a los procesos de regulación génica y subraya el papel cada vez más ubicuo de los RNAs no codificantes.

Resumiendo los datos reportados por el proyecto ENCODE, se puede decir que el 80% del genoma humano contiene elementos asociados a funciones transcripcionales y/o regulatorias, que las regiones de cromatina abierta comprenden el 15% del genoma y que en el 95% del genoma, por cada 8,000 pares de bases ocurre una interacción DNA – proteína, lo cual indica la elevada dinámica de expresión y regulación genómicas [8, 22]. Este nuevo panorama del genoma humano invita a una reflexión: en vez de considerar como “basura genómica” aquello que no entendemos, es mejor ser prudentes y considerar a nuestro genoma como una mina que apenas nos está revelando sus tesoros.

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. Avery, O. T., MacLeod, C. M., y McCarty, M. (1944) *J. Exper. Med.* **79**, 137–158
3. Watson, J. D. y Crick, F. H. C. (1953) *Nature* **171**, 737- 738

4. Watson, J. D. y Crick, F. H. C. (1953) *Nature* **171**, 964 - 967
5. Stent, G. S. (1968) *Science* **160**: 390 – 395
6. Sanger, F, Nicklen, S, y Coulson, A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463 - 5467
7. Doolittle, R. (1998) *Nature* **392**, 339 – 342
8. Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S., Collins, P., Davis, C. *et al* (2012) *Nature* **489**, 57 –74
9. Lander, E., Linton, L., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. *et al.* (2001) *Nature* **409**, 860 – 921
10. Chargaff, E., Vischer, E, Diniger, R., Green, C., y Misani, F. (1949) *J. Biol. Chem.* **177**, 405 - 416
11. Jukes, T. H. (1996) *J. Mol. Evol.* **42**, 377- 381
12. Koonin, E.V., Tatusov, R.L. y Rudd, K.E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11921 -11925
13. Barrell, B.G., Air G. M. y Hutchinson III, C. A. (1976) *Nature* **264**: 34 – 41
14. Fleischmann, R., Adams, M., White, O., Clayton, R., Kirkness, E. *et al.* (1995) *Science* **269**, 496 - 512
15. Pomerantz, R., y O'Donnell, M. (2010) *Cell Cycle* **9**, 2537 – 2543
16. Rocha, E. y Danchin, A. (2003) *Nat. Gen.* **34**, 377 – 378
17. Corona, J., Vilchis, A., Alba, L., Segal, C. y Valdés, V. (2012) XXIX Congreso Nacional de Bioquímica. Oaxaca, México.
18. Mighell, A, J., Smith, N. R., Robinson, P. A. y Markham A. F. (2000) *FEBS Lett.* **468**, 109 – 114
19. Pei, B., Sisu, C., Frankish, A., Howald, C., Habegger, L. *et al.* (2012) *Genome Biology* **13**, 1 – 26
20. Valdés, V., Vilchis, A., Alba, L., Rodarte, B., Segal, C., *et al* (2004) *Sci. Amer. (Lat)* **22**, 32 - 33
21. Orgel, L. y Crick, F. (1980) *Nature* **284**, 604 – 607
22. Djebali, S., Davis, C., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T. *et al.* (2012) *Nature* **489**, 101 – 108
23. Thurman, R., Rynes, E., Humbert, R., Vierstra, J., Maurano, M. *et al.* (2012) *Nature* **489**, 75 – 82
24. Bickmore, W. (2012) *Nature* **489**, 52 – 55
25. Ren, B. (2010) *Nature* **465**, 173 – 174

Semblanza del Dr. Víctor Valdés López.



El Dr. Valdés López es Profesor Titular del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realizó sus estudios de licenciatura (biología), maestría y doctorado en la misma Facultad de Ciencias y llevó a cabo estancias académicas en Montreal, Canadá y San Diego California. Fue becario del CONACYT, de la OEA y de la UNAM. También llevó a cabo una estancia académica extendida en el CINVESTAV, Unidad Irapuato. Estuvo adscrito temporalmente al Departamento de Biología Molecular de Plantas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Ha publicado más de 45 artículos y capítulos de libros tanto de investigación como de divulgación en revistas nacionales e internacionales. Ha impartido más de 150 conferencias de divulgación y seminarios de investigación dentro y fuera de la UNAM. Ha dirigido diversas tesis de licenciatura y de posgrado. Desde 1977, ha impartido la asignatura de Biología Molecular en la carrera de Biología y además participa o ha participado como profesor en diversos cursos de posgrado dentro y fuera de la UNAM. El Dr. Valdés, ha desempeñado diversos cargos académico-administrativos en la UNAM. Entre otros, ha sido Coordinador del Departamento de Biología, Jefe de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias, Subdirector de Apoyo a la Docencia de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y Secretario Académico de la Coordinación de Estudios de Posgrado. Actualmente es Consejero Universitario por la Facultad de Ciencias. Sus áreas de trabajo han abarcado desde el metabolismo del hierro y la diferenciación de células sanguíneas en mamíferos, hasta la biología molecular de plantas y la genómica evolutiva y comparada.