



Memoria del XLI Taller de Actualización Bioquímica



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina



Mensaje Bioquímico XXXVIII

MENSAJE

BIOQUÍMICO

XXXVIII

Editores: A. Butanda, A. Guevara, J. Guevara, D. Matuz, R. Lara y P. Torres

Vol. XXXVIII, 2014

ISSN 0188-137X

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. Editor Responsable: ALBERTO GUEVARA FLORES. 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 CARGRA-PHICS S.A. de C.V. Bosques de Duraznos #127 Piso 2. Bosques de las Lomas. C.P. 11700. México D.F. México. Foto: Antonio Altamira. Cristales de Yeso. Exposición Mineralógica. Dr. Victor M. Malpica Cruz. Instituto de Geología. UNAM. Diseño: José de Jesús Martínez González y Juan Antonio Rocha Santiago.

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

EDITORES:

**ARMANDO BUTANDA OCHOA
ALBERTO GUEVARA FLORES
JORGE GUEVARA FONSECA
DEYAMIRA MATUZ MARES
ROBERTO LARA LEMUS
PATRICIA VICTORIA TORRES DURÁN**

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

VOL. XLI

2014

5 de junio de 2014 a 4 junio de 2015

ÍNDICE

EDITORIAL	I
PROGRAMA	X
Jaime Dante Morán Zenteno “Supererupciones en el pasado de la tierra: El testimonio de las rocas mexicanas”	1
José Aguilera Ávila “Potencial terapéutico del fragmento C-terminal de la toxina tetánica”	17
Emma Saavedra Lira y Álvaro Marín-Hernández “Modelado cinético de vías metabólicas para entender su mecanismo de control”	45
Bertha González Pedrajo y José Eduardo Soto Guzmán “El inyectisoma de bacterias patógenas: dos historias de un dispositivo molecular”	65
Irma Romero Álvarez y Jazmín Espinosa Rivero “A 30 años del descubrimiento de <i>Helicobacter pylori</i> . Uso de plantas medicinales como fuente de terapias”	85
Alejandro Sosa Peinado “Ingeniería de las interacciones entre las proteínas y sus ligandos”	103
Ignacio Camacho Arroyo, Valeria Hansberg-Pastor y Aliesha González-Arenas “Papel de las hormonas sexuales en el crecimiento de tumores cerebrales humanos”	127
María Esther Rubio Ruiz, Verónica Guarner-Lans y Ana E. Peredo Escárcega “Medicina Darwiniana: el desarrollo de Síndrome Metabólico desde una perspectiva evolutiva”	145
Ángel Flores, Alfonso Díaz, Samuel Treviño y Eduardo M. Brambila “Efecto de una dieta hipercalórica en el desarrollo de dislipidemia y disglucemia, y su impacto en la citoarquitectura renal”	165

Ángel Zarain Herzberg, Jorge Fragoso-Medina, Rafael Estrada-Avilés y Gabriela Rodríguez	175
“La bomba de calcio y la calsecuestrina en el corazón: mecanismos transcripcionales que regulan su expresión”	
Gonzalo Flores Álvarez	197
“¿Es posible corregir los cambios en la comunicación dendrítica cortical causados por el envejecimiento?”	
Oscar Flores Herrera, Juan Pablo Pardo, Mercedes Esparza-Perusquía, Sofía Olvera-Sánchez, Guadalupe Guerra-Sánchez y Federico Martínez	201
“Dinámica de la red mitocondrial: Un recorrido por los fenómenos de fusión-fisión, los supercomplejos respiratorios y la arquitectura de las crestas”	
José Ramos Castañeda y Karla Javonny Sepúlveda Salinas	239
“Replicación del virus Dengue y la respuesta adaptativa al estrés del retículo endoplásmico. En la salud como en la enfermedad”	
Martín Escamilla del Arenal	253
“Modificaciones en la cromatina y herencia epigenética”	
Sergio Hernández	289
“Los parientes silvestres del chile <i>Capsicum annuum</i> un valioso recurso genético de México”	
Francisco Javier Sánchez García, Jacqueline Oliva Ramírez, María Maximina B. Moreno Altamirano	305
“Ritmos circadianos y respuesta inmune”	

XLI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
 Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 4 al 6 de junio de 2014
Actividades antes del medio día

HORA	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
8:00-9:00 am	INAUGURACIÓN	Dr. Alejandro Sosa Peinado Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. <i>"Ingeniería de las interacciones entre las proteínas y sus ligandos"</i>	Dr. Oscar Flores Herrera Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. <i>"Dinámica de la red mitocondrial: Un recorrido por los fenómenos de fusión-fisión, los supercomplejos respiratorios y la arquitectura de las crestas"</i>
9:00-10:00 am	Dr. Jaime Dante Morán Zenteno Instituto de Geología, UNAM. <i>"Supererupciones en el pasado de la tierra: El testimonio de las rocas mexicanas"</i>	Dr. Ignacio Camacho Arroyo Facultad de Química, UNAM. <i>"Papel de las hormonas sexuales en el crecimiento de tumores cerebrales humanos"</i>	Dr. José Ramos Castañeda Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. <i>"Replicación del virus Dengue y la respuesta adaptativa al estrés del retículo endoplásmico. En la salud como en la enfermedad"</i>
10:00-11:00 am	Dr. José Aguilera Instituto de Neurociencias, Universidad Autónoma de Barcelona, España. <i>"Potencial terapéutico del fragmento C-terminal de la toxina tetánica"</i>	M. en C. María Esther Rubio Ruiz Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" <i>"Medicina Darwiniana: el desarrollo de Síndrome Metabólico desde una perspectiva evolutiva"</i>	Dr. Martín Escamilla del Arenal Instituto de Fisiología Celular, UNAM. <i>"Modificaciones en la cromatina y herencia epigenética"</i>
11:00-12:00 am	Dra. Emma Saavedra Lira Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" <i>"Modelado cinético de vías metabólicas para entender su mecanismo de control"</i>	Dr. Ángel Flores Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <i>"Efecto de una dieta hipercalórica en el desarrollo de dislipidemia y disglucemia, y su impacto en la citoarquitectura renal"</i>	Dr. Sergio Hernández Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa. <i>"Los parientes silvestres del chile Capsicum annuum un valioso recurso genético de México"</i>
12:00-12:30 pm	Receso	Receso	Receso

XLI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
 Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 4 al 6 de junio de 2014
Actividades después del medio día

HORA	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
12:30-13:30 pm	<p>Dra. Bertha González Pedrajo Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. <i>"El inyectisoma de bacterias patógenas: dos historias de un dispositivo molecular"</i></p>	<p>Dr. Ángel Zarain Herzberg Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. <i>"La bomba de calcio y la calsecuestrina en el corazón: mecanismos transcripcionales que regulan su expresión"</i></p>	<p>Dr. Francisco Javier Sánchez García Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. <i>"Ritmos circadianos y respuesta inmune"</i></p>
13:30 -14:30 pm	<p>Dra. Irma Romero Álvarez Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. <i>"A 30 años del descubrimiento de Helicobacter pylori. Uso de plantas medicinales como fuente de terapias"</i></p>	<p>Dr. Gonzalo Flores Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <i>"¿Es posible corregir los cambios en la comunicación dendrítica cortical causados por el envejecimiento?"</i></p>	<p style="text-align: center;">ENTREGA DE CONSTANCIAS</p>



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico, Vol. XLI**, VI-IX, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>) (ISSN-0188-137X)

Editorial

Con sus 41 años de existencia, el Taller de Actualización Bioquímica (TAB) está dirigido a profesores y estudiantes a nivel licenciatura y posgrado, e investigadores de toda la República Mexicana, y propone la actualización, difusión y discusión del conocimiento científico entre los jóvenes académicos y estudiantes, promoviendo la interacción académica entre ellos.

Desde 1973, en la ponencia de apertura se había tratado un tema de bioquímica o algún suceso relacionado con la bioquímica, pero en esta ocasión, para conmemorar el año Internacional de la Cristalografía, el Dr. Jaime Dante Morán abrirá el TAB 2014. Fue fácil para el comité organizador escoger al Dr. Moran para iniciar el Taller con la conferencia inaugural: “Supererupciones en el pasado de la Tierra: el testimonio de las rocas mexicanas”, por su gran trayectoria y experiencia en la historia de los volcanes mexicanos y en el estudio de los cristales.

Para continuar con los temas bioquímicos contaremos con la participación de ponentes internacionales como es el caso del Dr. José Aguilera, quien nos platicará sobre la posibilidad de utilizar la toxina tetánica y moléculas derivadas de ésta con finalidades terapéuticas. La toxina tetánica está formada por dos subunidades, una responsable de los efectos tóxicos y de los síntomas del tétanos y la otra que es inocua. El dominio C-terminal de ésta inhibe el transporte de serotonina a través de las membranas sinápticas. Este efecto inhibitor la convierte en un fármaco potencial con más eficacia que el Prozac.

El Dr. Sergio Hernández nos presentará un trabajo sobre la importancia que tienen, como recurso genético, los chiles mexicanos, la preservación de este recurso y las pérdidas genéticas que sufre como especie, así como la reducción en su variación genética. Sin olvidar los cambios que producen las modificaciones propias del crecimiento de las poblaciones humanas sobre el medio ambiente.

El Dr. Gonzalo Flores nos hablará de las repercusiones que tiene el envejecimiento cerebral humano sobre la comunicación neuronal. Abordará los aspectos neuroquímicos y los cambios dendríticos corticales, así como los nuevos estudios farmacológicos que utilizan a la cerebrolisina y al resveratrol, entre otros, y sus efectos sobre la memoria y el aprendizaje durante el envejecimiento.

Revisaremos en el trabajo presentado por del Dr. Alejandro Sosa-Peinado, las interacciones específicas entre las proteínas y sus ligandos, como esto determina las bases moleculares de su especificidad. Las interacciones no covalentes de las proteínas, sus contribuciones entrópicas, entálpicas, los modelos de interacción y algunas técnicas para determinar la energética de sus interacciones.

El M. en. C. Ángel Flores nos hablará del daño que ocasionan las enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes e hipertensión, el síndrome metabólico y como todas estas enfermedades repercuten sobre la insuficiencia renal crónica. Las vías de señalización y mecanismos moleculares que involucran estos daños renales, tanto en modelos animales como en los seres humanos. El trabajo del Dr. Ignacio Camacho Arroyo analiza el papel que juegan las hormonas sexuales en el desarrollo de tumores en el sistema nervioso central y la importancia de los respectivos receptores como elementos de diagnóstico y como blancos terapéuticos.

Por otra parte con el trabajo del Dr. Javier Sánchez comprenderemos como el desarrollo de patrones cíclicos en los seres vivos está determinado por el movimiento de rotación de nuestro planeta. Cómo son regulados los ritmos circadianos y las implicaciones que tienen estos en relación a procesos vitales como el metabolismo celular y la respuesta inmune.

El trabajo la Dra. González Pedrajo abordará el papel que juega el inyectisoma en el mecanismo de infección de bacterias Gram negativas patógenas y las posibles aplicaciones biomédicas y biotecnológicas derivadas del estudio de esa maquinaria molecular.

El trabajo del Dr. Oscar Flores-Herrera muestra los avances en el conocimiento de la dinámica mitocondrial, el hecho de que las células contienen un retículo mitocondrial en vez de mitocondrias aisladas, que los complejos mitocondriales y la F1F0-ATP sintasa no se encuentran como unidades individuales sino formando supercomplejos, que las crestas no son simples pliegues de la membrana interna sino que provienen de estructuras tubulares, y que las mitocondrias se encuentran en un estado dinámico de fusión y fisión que se altera con el estado energético de la célula y en condiciones patológicas.

La Dra. Irma Romero Álvarez presentará un trabajo sobre *Helicobacter pylori* y el uso de plantas medicinales como fuente de terapias en algunas patologías como la gastritis crónica, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico. De tal manera que resulta imprescindible la búsqueda de nuevos tratamientos y compuestos para prevenir y controlar las enfermedades relacionadas con *Helicobacter pylori*.

En el trabajo del Dr. Ángen Zarain se revisarán los conocimientos actuales sobre la regulación transcripcional de los genes SERCA2 y CASQ2 en el corazón normal y con patología. El control preciso de los niveles de Ca^{2+} durante el ciclo de contracción-relajación, el papel que juega en la función contráctil normal del cardiomiocito y como la alteración del Ca^{2+} durante el proceso de acoplamiento excitación-contracción (AEC) es la principal característica observada en la hipertrofia cardíaca patológica y en la insuficiencia cardíaca.

Con el trabajo de la M. en C. Esther Rubio tendremos la oportunidad de acercarnos a los conceptos de la medicina darwiniana como una aplicación de la biología evolutiva a la medicina. Esta corriente propone que las enfermedades contemporáneas, como el síndrome metabólico y la obesidad, resultan de la incompatibilidad entre la información genética y las modificaciones adaptativas adquiridas en medios primitivos, expuesto a nuevos estilos de vida.

Los Dres. Emma Saavedra y Álvaro Marín mostrarán cómo los modelos computacionales de las vías metabólicas pueden predecir las concentraciones de intermediarios y flujos metabólicos, a partir de las propiedades cinéticas de sus enzimas y transportadores involucrados. Como la falta de regulación y control en el metabolismo de las células humanas puede originar o favorecer el cáncer, la diabetes o enfermedades de tipo metabólico.

En su trabajo, el Dr. Ramos Castañeda hace un interesante análisis acerca de los mecanismos por los cuales el virus del dengue es capaz de activar la respuesta a proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico de células de mamíferos. Así mismo ofrece una perspectiva del papel que pueden tener estos mecanismos en la respuesta inmune innata en los mosquitos vectores de la enfermedad.

Finalmente revisaremos cómo en los últimos años se han descrito diversos estudios que tienen que ver con la regulación epigenética, como la metilación del DNA e histonas y la fosforilación de estas últimas, que son consideradas marcas epigenéticas. Veremos como el término epigenética ha perdido su significado puntual al utilizarse indiscriminadamente para describir a los eventos que ocurren en la cromatina. El Dr. Escamilla del Arenal nos platicará acerca de las modificaciones en la cromatina y la herencia epigenética.

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Junio de 2014

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.

Por la difusión oportuna del Taller de Actualización Bioquímica 2014 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. 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, ya que sin su apoyo no podríamos realizar el Taller de Actualización Bioquímica: ASPELAB, McGraw-Hill, y ELSEVIER.

XLI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 4 al 6 de junio de 2014

MIÉRCOLES

8:00 -9:00 am
Inauguración

Conferencias

9:00 -10:00 am

Dr. Jaime Dante Morán Zenteno

Instituto de Geología, UNAM.

“Supererupciones en el pasado de la tierra: El testimonio de las rocas mexicanas”

10:00 -11:00 am

Dr. José Aguilera

Instituto de Neurociencias, Universidad Autónoma de Barcelona. España

“Potencial terapéutico del fragmento C-terminal de la toxina tetánica

11:00 -12:00 am

Dra. Emma Saavedra Lira

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

“Modelado cinético de vías metabólicas para entender su mecanismo de control”

12:30 -13:30 pm

Dra. Bertha González Pedrajo

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

“El inyectisoma de bacterias patógenas: dos historias de un dispositivo molecular”

13:30-14:30 pm

Dra. Irma Romero Álvarez

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

“A 30 años del descubrimiento de Helicobacter pylori. Uso de plantas medicinales como fuente de terapias”

XLI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 4 al 6 de junio de 2014

JUEVES

8:00 -9:00 am

Dr. Alejandro Sosa Peinado

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

“Ingeniería de las interacciones entre las proteínas y sus ligandos”

9:00 -10:00 am

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Facultad de Química, UNAM.

“Papel de las hormonas sexuales en el crecimiento de tumores cerebrales humanos”

10:00 -11:00 am

M. en C. María Esther Rubio Ruiz

Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

“Medicina Darwiniana: el desarrollo de Síndrome Metabólico desde una perspectiva evolutiva”

11:00 -12:00 am

Dr. Ángel Flores

Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

“Efecto de una dieta hipercalórica en el desarrollo de dislipidemia y disglucemia, y su impacto en la citoarquitectura renal”

12:30 -13:30 pm

Dr. Ángel Zarain Herzberg

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. UNAM.

“La bomba de calcio y la calsecuestrina en el corazón: mecanismos transcripcionales que regulan su expresión”

13:30 -14:30 pm

Dr. Gonzalo Flores

Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

“¿Es posible corregir los cambios en la comunicación dendrítica cortical causados por el envejecimiento?”

XLI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 4 al 6 de junio de 2014

VIERNES

8:00 -9:00 am

Dr. Oscar Flores Herrera

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

“Dinámica de la red mitocondrial: Un recorrido por los fenómenos de fusión-fisión, los supercomplejos respiratorios y la arquitectura de las crestas”

9:00 -10:00 am

Dr. José Ramos Castañeda

Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública.

“Replicación del virus Dengue y la respuesta adaptativa al estrés del retículo endoplásmico. En la salud como en la enfermedad

10:00 -11:00 am

Dr. Martín Escamilla del Arenal

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

“Modificaciones en la cromatina y herencia epigenética ”

11:00 -12:00 am

Dr. Sergio Hernández

Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa.

“Los parientes silvestres del chile *Capsicum annum* un valioso recurso genético de México”

12:30 -13:30 pm

Dr. Francisco Javier Sánchez García

Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

“Ritmos circadianos y respuesta inmune”

13:30 -14:30 pm

ENTREGA DE CONSTANCIAS

XLI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 4 al 6 de junio de 2014

Comité organizador del XLI Taller de Actualización Bioquímica

<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>

Armando Butanda Ochoa
Facultad de Medicina, UNAM
abutanda11@hotmail.com

Alberto Guevara Flores
Facultad de Medicina, UNAM
guevarafa@yahoo.com.mx

Jorge Guevara Fonseca
Facultad de Medicina, UNAM
jorge.guevara@comunidad.unam.mx

Deyamira Matuz Mares
Facultad de Medicina, UNAM
deyabq@comunidad.unam.mx

Roberto Lara Lemus
Facultad de Medicina, UNAM
betony44@hotmail.com

Patricia Victoria Torres Durán
Facultad de Medicina, UNAM
pavitodu@yahoo.com.mx



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 1-16, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014).

<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>

(ISSN-0188-137X)

SUPERERUPCIONES EN EL PASADO DE LA TIERRA: EL TESTIMONIO DE LAS ROCAS MEXICANAS

SUPERERUPTIONS FROM THE PAST: TESTIMONY OF THE MEXICAN ROCKS

Dante J. Morán Zenteno

Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P 03510, México D.F.

Resumen

Las calderas volcánicas de colapso son rasgos geológicos muy prominentes que se originan por erupciones volcánicas explosivas de gran escala. A pesar de que se han reconocido calderas en diferentes regiones del mundo el hombre moderno no ha observado en tiempos históricos erupciones mayores asociadas a estas estructuras. La magnitud de estos eventos es muy superior a la de las erupciones mayores observadas por el hombre moderno como las de los volcanes Vesubio, Tambora, Krakatoa o Pinatubo. Por esta razón que se les ha denominado supererupciones.

Las calderas de colapso se forman por encima de zonas de acumulación de fundido o magma llamadas cámaras magmáticas. La salida de magma de la cámara hacia la superficie y la disminución de la presión interna de la cámara producen la ruptura y caída del techo hacia el interior de la cámara lo que genera una depresión en la superficie que puede ser circular, elíptica o irregular. El carácter explosivo de estas erupciones se debe a la presencia de volátiles disueltos en el magma como el H₂O y CO₂ que en el camino de ascenso se exolven y eventualmente producen la explosión y fragmentación del magma. La salida del material volcánico fragmentado y los gases pueden genera columnas que eventualmente llegan a alcanzar la estratosfera. Las cenizas volcánicas se pueden esparcir por grandes distancias ya sea en forma de lluvias de ceniza o por medio del mecanismo llamado flujo piroclástico. Estos últimos forman depósitos de ceniza y fragmentos denominados ignimbritas.

En México existe un extenso registro de ignimbritas y calderas antiguas que atestiguan la existencia en el pasado de supererupciones. Este registro constituye una de las expresiones más prominentes de volcanismo explosivo en el planeta y lo convierte en un laboratorio natural para estudio y mejor comprensión de las supererupciones.

Palabras clave: *Caldera, ignimbrita, supererupción, Sierra Madre Occidental*

Abstract

Volcanic collapse calderas are prominent geologic features originated by large scale explosive eruptions. A number of collapse caldera structures have been recognized in the world, however, no major eruptions associated with these structures have been observed by modern mankind. The magnitude of these events is much larger than major eruptions observed by modern mankind like those of Vesuvius, Tambora, Krakatoa and Pinatubo volcanoes. For this reason, eruptions associated with collapse calderas are known as supereruptions.

Collapse calderas are formed over melt reservoirs known as magma chambers. Magma output and a decrease in a reservoir's internal pressure produce the rupture of the roof and its collapse within the chamber. This generates a depression on the surface above the chamber that may have circular, elliptical or irregular shape. The explosive nature of this kind of eruption is related to the presence of volatiles dissolved in the magma. During magma ascent, volatiles are

exsolved and eventually generate explosions and magma fragmentation. The output of fragmented volcanic material and gases may eventually produce columns that can reach the stratosphere. Volcanic ashes spread for long distances in the form of ash clouds or pyroclastic flows. The second mechanism produces ash accumulations known as ignimbrites.

There is an extensive record of ignimbrites and collapse calderas in Mexico that indicate several supereruptions in the past. This extensive cover of ignimbrites represents one of the largest explosive volcanic provinces in the world.

Keywords: *Caldera, ignimbrite, supereruption, Sierra Madre Occidental*

Introducción

La actividad volcánica ha representado para la sociedad una fuente de preocupación y temor por su capacidad destructiva y por los efectos de corto y largo plazo que puede causar en el medio ambiente. El crecimiento de las zonas urbanas y de infraestructura en zonas volcánicas ha aumentado el riesgo asociado a estos fenómenos naturales y en muchos casos no parece haber habido respuestas de planeación y prevención suficientemente adecuadas a la magnitud de la amenaza que representan muchos centros volcánicos.

En tiempos históricos se han observado numerosos eventos eruptivos, algunos de ellos de gran tamaño y explosividad que han causado un número elevado de pérdidas de vidas humanas e infraestructura. Otros eventos volcánicos muestran o han mostrado tener una actividad menor, aunque sus efectos ambientales en el entorno geográfico pueden ser bastante dañinos.

Existen diferentes tipos de volcanes en términos de su tamaño, forma y tipo de actividad eruptiva. Uno de los tipos más peligrosos y de mayor tamaño son los estratovolcanes o volcanes compuestos porque son volcanes de larga vida y porque pueden desarrollar episodios de mucha explosividad con la emisión de un volumen considerable de cenizas volcánicas y emisiones de lava. Dentro de este tipo existen ejemplos de volcanes actualmente activos en México como el volcán Popocatepetl, el Volcán de Fuego de Colima y el Chichón. Otros volcanes de este tipo que se encuentra más bien en un estado latente son el Pico de Orizaba y el nevado de Toluca. A nivel mundial destacan algunos volcanes que han tenido grandes erupciones en tiempos históricos como el Vesubio, en Italia, Krakatoa y Tambora, en Indonesia, Santa Helena, en Estados Unidos, y Pinatubo en Filipinas.

La capacidad destructiva de estas erupciones se debe a la emisión de grandes volúmenes de ceniza que pueden esparcirse por áreas extensas y de los llamados flujos piroclásticos que son flujos de ceniza incandescente que se desplazan a gran velocidad en trayectorias cuesta debajo de los volcanes y que pueden alcanzar grandes distancias. Este último tipo de emisiones destruyen y sepultan todo lo que encuentran a su paso porque alcanzan velocidades de hasta 200 km/h y temperaturas que pueden llegar a los 1000°C. Algunos casos históricos bien conocidos de eventos de destrucción por los flujos piroclásticos son el que destruyó y sepultó la Ciudad de Pompeya en el año 79 d.C. y el que sepultó la Ciudad de Saint Pierre en la Isla Martinica en 1902.

Actualmente la actividad de los volcanes se clasifica en varios tipos que incluyen las erupciones de los tipos hawaiano, stromboliano, volcánico y pliniano con incremento respectivo en el nivel de explosividad. (Figura 1). Esta explosividad de las emisiones volcánicas se debe a que los magmas en el interior de la tierra tienen disueltos volátiles como el H₂O y el CO₂. Cuando los magmas ascienden por el conducto de salida los gases comienzan a separarse de la fase fundida lo que eventualmente puede generar explosiones y salidas en chorro desde el cráter al estilo de las botellas de champaña.

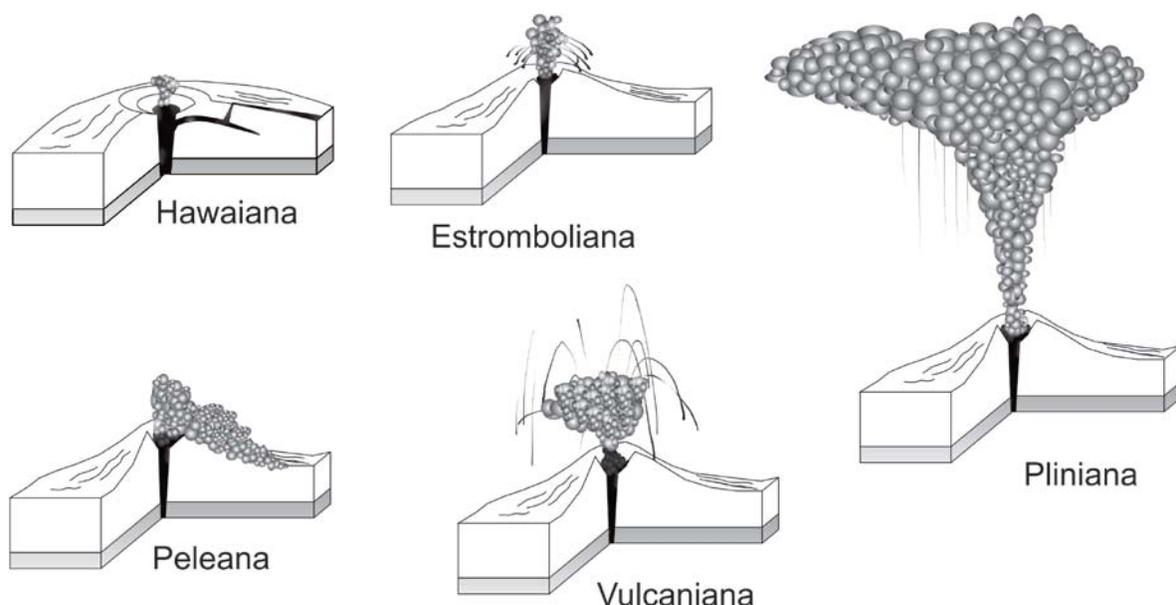


Figura 1. Diferentes estilos eruptivos en función del nivel de explosividad

La explosividad de los volcanes se puede expresar en términos de un parámetro usado por los volcanólogos al que se llama *índice de explosividad volcánica* [1]. Este índice se basa en la estimación de volumen del material volcánico expulsado, la altitud que alcanza la las emisiones de ceniza, y cuánto tiempo dura la erupción. La escala va del 1 al 8, siendo este último nivel el de mayor explosividad (Figura 2).

	Descripción	Volumen material arrojado	Altura columna eruptiva	Clasificación		Inyección Troposférica	Inyección Estratosférica	Frecuencia	Ejemplo
0	No explosiva	< 10000 m ³	100 m	Hawaiana		Despreciable	No	Constante	Kilauea
1	Pequeña	10 ³ -10 ⁶ m ³	100 - 1000 m					Estromboliana	Menor
2	Moderada	10 ⁶ -10 ⁹ m ³	1-5 km	Vulcaniana	Moderada	Semanal	Galeras (1993), Sinabung (2010)		
3	Moderada a grande	10 ⁹ -10 ¹² m ³	3-15 km		Pliniana	Substantial	Possible	Meses	Nevado del Ruiz (1985), Soufrière Hills (1995)
4	Grande	0.1-1 km ³	10-25 km	Ultra-pliniana			Pliniana	Definida	≥ 1 año
5	Muy grande	1-10 km ³	>25		Ultra-pliniana	Pliniana		Substantial	Significante
6		10-100 km ³		≥ 100 años			Veniaminof (c. 1750 BC), Krakatoa (1883), Pinatubo (1991)		
7		100-1000 km ³		≥ 1000 años			Tambora (1815)		
8		>1000 km ³		≥ 10000 años			Yellowstone (640,000 BC), Toba (74,000 BC), Taupo (24,500)		

Figura 2. Escala que muestra los diferentes niveles del índice de explosividad volcánica

Los eventos volcánicos más explosivos y destructivos están generalmente asociados a la formación de una columna muy alta de ceniza y gases que emanan de los conductos volcánicos y que puede alcanzar 30 km por encima del cráter. Este tipo de actividad se le llama erupción Pliniana en honor de Cayo Plinio Segundo, quien realizó las primeras descripciones de este tipo de procesos durante la erupción del Vesubio que destruyó Pompeya. El propio Plinio perdió la vida durante la erupción, pero su sobrino Plinio “el joven”, quien lo acompañaba cuando se inició del evento volcánico, completó las descripciones. Cuando la columna pliniana pierde fuerza se puede colapsar y formar flujos piroclásticos que descienden por las laderas de los volcanes a gran velocidad (Figura 3).

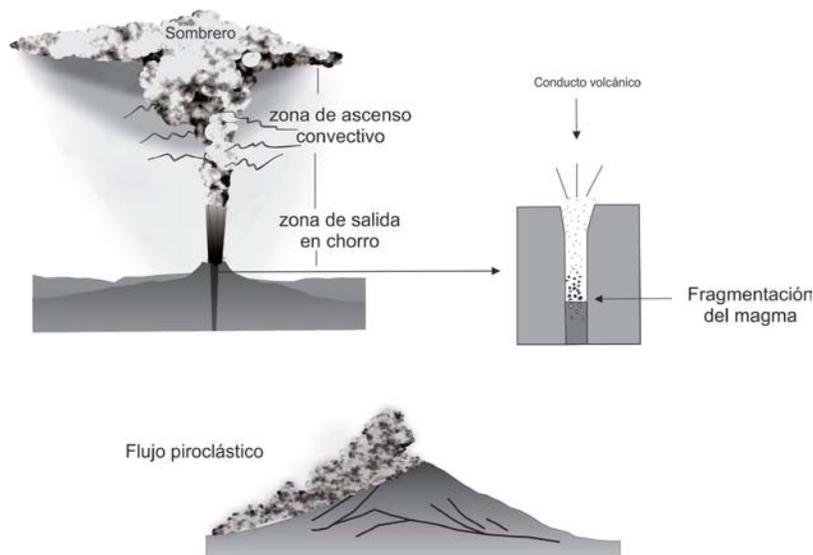


Figura 3. Esquema de una columna pliniana que muestra sus diferentes zonas. También se muestra un esquema del conducto de salida y de la formación de un flujo piroclástico.

Las fuerzas que posibilitan la formación de una columna pliniana tiene que ver con la inercia de salida de las cenizas y gases debidas a la explosividad propia de la lava que asciende por el conducto volcánico y por la menor densidad de los gases de la columna con respecto a al aire atmosférico. Esto posibilita que los gases y cenizas de la columna eventualmente alcancen la estratosfera en donde el aire es menos denso. Esto hace que se detenga el ascenso y las cenizas se dispersen de forma horizontal confiriéndole a la columna un aspecto de hongo nuclear.

El origen del magma y la formación de calderas volcánicas

Las erupciones más voluminosas y explosivas documentadas históricamente normalmente tienen emisiones de cenizas con volúmenes menores de 100 km^3 , es decir con índices de explosividad volcánica menores de 7. Solamente el volcán Tambora, ubicado en Indonesia, rebasó este límite ya que durante la erupción de 1815 emitió cerca de 160 km^3 . Los efectos de esta erupción fueron tan devastadores que clima de la Tierra cambió notablemente, con un enfriamiento de tal medida que prácticamente no hubo verano en el hemisferio norte en el año 1816. El examen del registro de rocas volcánicas y acumulaciones

de ceniza prehistóricas muestra que en el pasado ocurrieron erupciones mucho mayores y más explosivas que las que se han registrado históricamente, algunas de ellas alcanzaron volúmenes superiores a los 1000 km³. Estas antiguas erupciones han dejado un registro geológico abundante y normalmente están asociadas a estructuras volcánicas mayores llamadas calderas de colapso.

Las calderas volcánicas de colapso son depresiones de varios kilómetros de diámetro que se producen como resultado del colapso del techo de una cámara, es decir, una acumulación de magma en el subsuelo, al experimentar esta un súbito vaciamiento durante una gran erupción [2,3]. La salida de material volcánico, principalmente en forma de ceniza y gases, hacen que la cámara magmática pierda presión interna y no pueda sostener el caparazón o techo de roca que la separa de la superficie del terreno (figura 4). La caída del caparazón dentro de la cámara magmática impulsa aún más la salida del magma.

Las acumulaciones de magma en el subsuelo, en forma de cámaras magmáticas, es un fenómeno transitorio porque normalmente el subsuelo, incluida la corteza y el manto de la Tierra, se encuentran en estado sólido. Aunque estas zonas del interior de la Tierra se encuentran temperaturas elevadas, de cientos o miles de grados centígrados, la alta presión a la que se están sujetas impiden que las rocas se fundan. El flujo del manto de la Tierra que acompaña el desplazamiento horizontal de las placas tectónicas es un flujo en estado sólido, en una condición que los físicos denominan viscoelástica. Se trata de un flujo lento, a una velocidad similar a la que nos crecen las uñas.

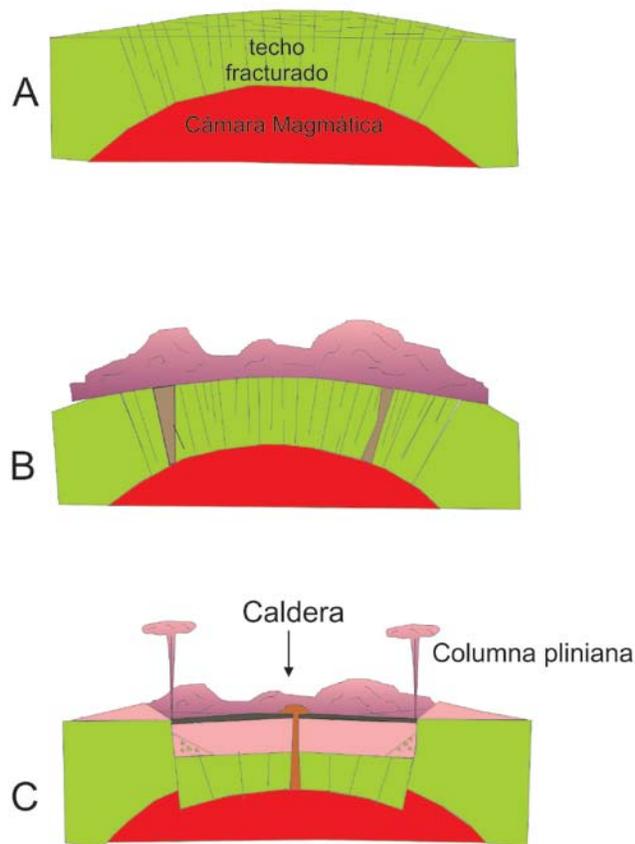


Figura 4. Evolución de una Caldera de Colapa. A) Etapa de sobrepresión y fracturamiento del techo de la cámara, B) Inicio de la actividad eruptiva y caída de la presión interna de la cámara, C) Colapso del techo de la cámara y actividad eruptiva máxima.

¿En qué condiciones se forma entonces el magma? Esto ocurre en alguna de dos posibles circunstancias que favorecen la fusión parcial del interior sólido de la corteza y el manto superior: que se introduzca agua y otros volátiles al interior de la Tierra o que una zona del interior caliente experimente un proceso de descompresión. Cuando una placa converge con otra y una de ellas se hunde debajo de la otra en un proceso llamado subducción, la placa inferior se reintroduce al manto de la Tierra arrastrando sedimentos y roca fracturada que contienen agua en sus poros y fracturas, pero además tienen agua en la estructura de sus minerales. En las zonas en donde el agua se desprende y esta se inyecta en el manto de la Tierra se produce fusión parcial y ascenso de magmas. Cuando dos placas se separan se genera una zona de fractura que tiende a abrirse y debajo

de esa zona de fractura disminuye la presión del interior del manto. Esta disminución de presión favorece la fusión parcial del manto y entonces se forman lavas basálticas que ascienden y se derraman en la zona de fractura.

El magma que se forma en el manto superior y en la corteza de la Tierra, asciende y puede eventualmente formar acumulaciones cercanas a la superficie. Es en estas circunstancias cuando se forman las cámaras magmáticas. El magma es una mezcla de fundido silicatado y de cristales que contiene volátiles disueltos como el agua y el CO₂. En su camino de ascenso se van formando más cristales y eventualmente comienzan a exolverse los volátiles en forma de burbujas que van creciendo en tamaño. Cuando el magma sale de la cámara magmática en su camino a la superficie las burbujas de gas llegan a ser tan grandes que eventualmente se producen explosiones que fragmentan el fundido silicatado y los cristales produciéndose erupciones muy energéticas. Entre más sílice (SiO₂) y volátiles contiene un magma, las erupciones son más explosivas. El material fragmentado sale a la superficie en forma de partículas y fragmentos grandes y se incorporan a una columna pliniana o siguen trayectorias balísticas para acumularse alrededor de la caldera o del cráter de un volcán. Cuando las partículas finas de fundido son expulsadas por el conducto de salida y son introducidas en la atmósfera se solidifican y forman la llamada ceniza volcánica. Estas suelen formar partículas finas de vidrio volcánico y son acompañadas por los cristales que ya se habían formado dentro del magma en el subsuelo. Los fragmentos más grandes derivados de magmas ricos en sílice se solidifican y forman un tipo particular de roca conocida como pómez. Entonces las acumulaciones de ceniza fina, cristales y fragmentos de pómez forman acumulaciones de ceniza que cuando se solidifican forman una roca que los geólogos conocen como toba.

Los flujos piroclásticos y las ignimbritas

En las erupciones explosivas pueden generar lluvias de ceniza fina o bien flujos piroclásticos. Estos últimos se desplazan a gran velocidad y pueden alcanzar distancias de varias decenas de kilómetros. La movilidad de los flujos piroclásticos se debe a un fenómeno que los volcanólogos llaman fluidización. Cuando la masa de gases calientes y partículas incandescentes avanza lateralmente su movimiento se sostiene porque el arrastre del gas caliente sobre las partículas impide que estas se asienten y esto es ayudado también por la incorporación de aire en el frente del flujo que se calienta y ejerce esta función de

arrastre de partículas hacia arriba. Esto confiere al flujo una especie de efecto de colchón que le impide asentarse y le permite seguir avanzando. Cuando finalmente las partículas y fragmentos que forman el flujo piroclásticos se comienzan a depositar en el terreno se forma una acumulación de material volcánico que puede permanecer caliente por mucho tiempo con escape de gases que forman salidas del tipo de las chimeneas. A estas acumulaciones extensas de ceniza y fragmentos producidos por flujos piroclásticos se les llama ignimbritas.

En algunos casos, cuando las acumulaciones de cenizas originadas por flujos piroclásticos son muy calientes y de espesor grande, es decir, de decenas de metros, el efecto del peso y el calor hacen que los fragmentos de pómez y de ceniza se aplasten. Esto confiere a las ignimbritas un aspecto de bandas discontinuas subhorizontales que se pueden observar aún a escala microscópica. A este tipo de ignimbritas se les llama soldadas y su densidad es mayor que aquellas en los que los fragmentos permanecen sin deformación. La superficie que cubren las ignimbritas de un solo evento volcánico pueden extenderse por áreas de cientos de km^2 , sin embargo, las cenizas finas se esparcen por la columna pliniana pueden extenderse por miles de km^2 .

Calderas y superupciones

La investigación científica para reconstruir grandes erupciones en el pasado de la Tierra ha permitido reconocer varios eventos significativos en diferentes partes del planeta. Los estudios que se realizan están enfocados a reconocer estructuras del tipo de las calderas y los depósitos producidos por los flujos piroclásticos y acumulaciones de lluvias de ceniza y derrames de lava. Algunas de las grandes erupciones no son realmente muy explosivas y se expresan como grandes volcanes formados principalmente por lava. Tal es el caso, por ejemplo de los volcanes de la región de Hawái que han producido acumulaciones de rocas derivadas de derrames lávicos que se distribuyen por miles de kilómetros cuadrados.

Las grandes erupciones explosivas se relacionan a estructuras de caldera que pueden ser reconocidas por las imágenes de satélite o por fotografías aéreas. Dentro de los ejemplos de estructuras asociadas a grandes erupciones explosivas en tiempos prehistóricos se encuentran las calderas de Yellowstone y La Garita, en los Estados Unidos, la de Toba, en Indonesia, la de Taupo en Australia y la de la Pacana en los Andes, entre otras. Estas calderas experimentaron eventos que produjeron volúmenes de cenizas superiores a los 1000 km^3 por eso han recibido

el calificativo de supervolcanes. En especial, para la caldera de la Garita, se ha documentado una erupción que generó un volumen de cenizas de 5000 km³. Comparadas con las erupciones históricas, estas erupciones resultan ser colosales por lo que se les ha aplicado el calificativo de supererupciones. Aunque el hombre civilizado no ha observado eventos como estos, su documentación y características se han descifrado gracias al análisis de la estructura de las calderas y de las características y extensión de los depósitos volcánicos asociados. También es posible conocer su edad de formación gracias a los distintos procedimientos desarrollados en las geociencias para fechar las rocas. Estos procedimientos se basan en la presencia de isótopos radioactivos. El balance de los isótopos radioactivos y de los isótopos “hijos” que resultan de su decaimiento permite hacer estimaciones del tiempo que ha transcurrido desde que dichas rocas se formaron.

Una de las calderas más grandes reconocidas hasta ahora es la caldera de Toba, en Indonesia. Se trata de una estructura que tiene forma elíptica cuyos diámetros largo y corto tienen respectivamente 100 y 30 km de largo (figura 5). La caldera de Toba experimentó una erupción muy significativa hace aproximadamente 75,000 años lo que produjo un volumen de cenizas cercano a los 2,800 km³ [4]. La depresión de la caldera está ocupada actualmente por un Lago. Posterior a esta erupción se desarrolló una prominencia central en la caldera debido a la reinyección de magma en la cámara magmática. Esta erupción es considerada la más grande del periodo Cuaternario (últimos 2.5 millones de años) y se ha especulado que produjo un cuello de botella en la evolución de los homínidos debido a los efectos de enfriamiento que produjo en el clima. Esto ha sido inferido de los relojes genéticos del homo sapiens, aunque existen todavía problemas para que esta hipótesis sea aceptada por la comunidad científica [5].

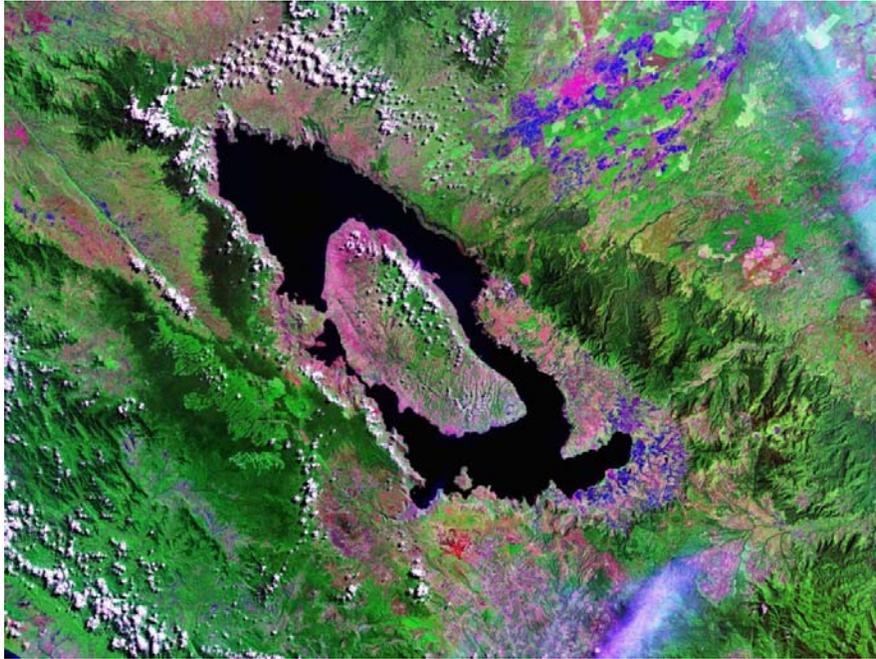


Figura 5. Imagen Landsat de la Caldera de Toba, Indonesia.

Otra de las calderas mayores reconocidas hasta ahora es la caldera de Yellowstone que se distribuye en la intersección de los estados de Montana, Wyoming e Idaho en el noroeste de los Estados Unidos. La caldera tiene una forma un tanto irregular pero sus dimensiones principales son de 72 por 55 km. El campo volcánico continúa actualmente desplegando mucha actividad de manantiales y geiseres, así como de sismos, y es el sitio de uno de los parques nacionales más visitados en el mundo. La caldera de Yellowstone se formó a partir de tres eventos eruptivos que ocurrieron hace 2.1, 1.3 y .64 millones de años [6]. El evento eruptivo ocurrido hace 2.1 millones de años produjo tal cantidad de cenizas que estas se esparcieron por más de la mitad del territorio de Estados Unidos. Debido a su actividad sísmica la caldera de Yellowstone es objeto de vigilancia volcanológica muy activa por parte del Servicio Geológico de los estados Unidos ya que podría desarrollar un nuevo evento eruptivo.

México: Territorio de calderas e ignimbritas antiguas

El territorio mexicano cuenta con un registro muy abundante de supererupciones que ocurrieron en el pasado Geológico. De hecho, la Sierra

Madre Occidental está caracterizada, desde el punto de vista geológico, como una cubierta de ignimbritas de gran volumen que atestiguan abundantes erupciones explosivas que se desarrollaron en la Era Cenozoica, principalmente entre 35 y 20 millones de años antes del presente [7]. El registro de ignimbritas se extiende hacia la actual Península de Baja California y también hacia la Sierra Madre del Sur. La extensión total de los depósitos volcánicos es cercana a los 300,000 km², lo que equivaldría a 350 supererupciones de 1000 km³ cada una [8]. También existen algunas calderas con depósitos de ignimbrita asociados en la actual Faja Volcánica Mexicana, también conocido como Eje Neovolcanico. Las calderas de la Faja Volcánica Mexicana nos son tan grandes ni abundantes como las que deben haber existido en la Sierra Madre Occidental, pero su presencia ha sido bien reconocida y estudiada. En realidad la Faja Volcánica Mexicana, que comenzó a edificarse hace 20 millones de años y que continua actualmente activa, está formada principalmente por estratovolcanes como el Popocatepetl y por numerosos conos volcánicos de pequeña escala como el Parícutín y el Xitle.

La Sierra Madre Occidental es la mayor provincia geológica de ignimbritas de distribución continua en el mundo. Existen otras provincias geológicas antiguas aún mayores identificadas en el planeta pero se estas se encuentra actualmente fragmentas y dispersas. Por el tiempo que ha transcurrido desde que se formaron las ignimbritas de la Sierra Madre la erosión fluvial ha cavado profundos cañones que han conferido a esta región un relieve muy abrupto. El origen de un volumen tan grande de depósitos de ignimbritas ha sido objeto de mucho interés científico. Existen grupos de investigación mexicanos e internacionales que han enfocado sus esfuerzos en tratar de entender las causas tectónicas que propiciaron la formación de esta extensa provincia geológica. En todo caso, la abundancia de ignimbritas y de calderas debe haber estado asociada a un alto flujo de calor proveniente del interior de la Tierra y a la presencia de volátiles como el agua. Estas condiciones se relacionaron seguramente a la subducción de una placa oceánica antigua que se hundió por un periodo prolongado debajo de la margen occidental de México desde la era Mesozoica hasta la era Cenozoica [7]. La actividad volcánica en la región fue tan continua que las calderas que emitían los flujos piroclásticos y las cenizas de caída eran cubiertas por emisiones posteriores. Por esta razón y por la profunda erosión que ha experimentado la región ha sido difícil identificar las estructuras de las calderas a pesar de los esfuerzos científicos por delinearlas. Dentro de las calderas mayores identificadas se encuentran la de Ocampo y Tomochic en la el Estado de Chihuahua, la de Chupaderos en el Estado de Durango y la del Nayar en el Estado de Nayarit [8].

En la Sierra Madre del Sur se han identificado diferentes calderas antiguas cuya edad fluctúa entre los 38 y 32 millones de años. Los depósitos de ignimbrita asociados a estas calderas se extienden principalmente en los estados de México, Guerrero, Michoacán, y Morelos, en una región que actualmente ya no cuenta con volcanismo activo. Debido a la erosión intensa en la región, las estructuras caldéricas y los depósitos de ignimbrita han sido profundamente erosionados y exhumados, de tal manera de que las depresiones originales y su relleno de rocas volcánicas se encuentran actualmente formando prominencias orográficas. Este tipo de inversión del relieve se debe a que las ignimbritas soldadas de estos centros volcánicos son más resistentes a la erosión que las rocas del entorno por lo que el drenaje se encajó principalmente en los alrededores. La caldera mayor identificada en esta región es la caldera de Tilzapotla que se encuentra ubicada al sur de la Ciudad de Cuernavaca y que se formó hace 34.2 millones de años [9] (Figura 6). Las dimensiones principales de esta caldera de forma elíptica son 24 X 34 km y se ha estimado que su volumen original de material volcánico fue superior a los 600 km³. Otras calderas antiguas identificadas en la región son las de la región de Taxco, Estado de Guerrero, y las de los sectores Sultepec-La Goleta y Valle de Bravo, Estado de México.

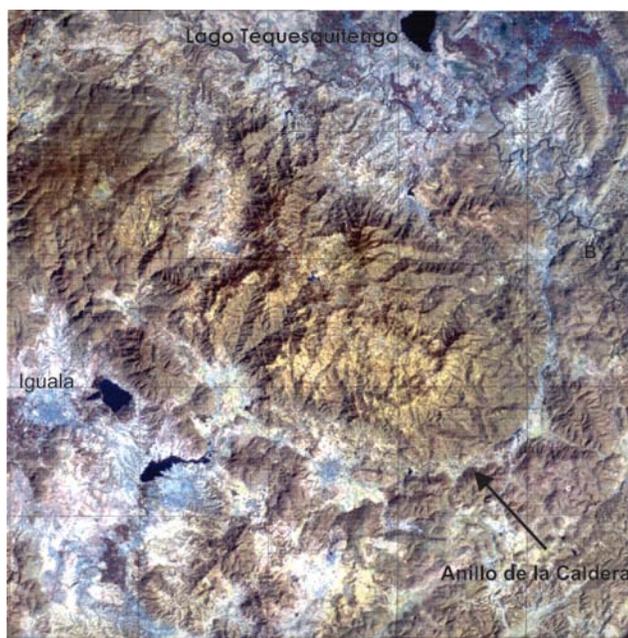


Figura 6. Imagen Landsat de la caldera de Tilzapotla, estados de Morelos y Guerrero.

Las ignimbritas y la cantera rosa mexicana

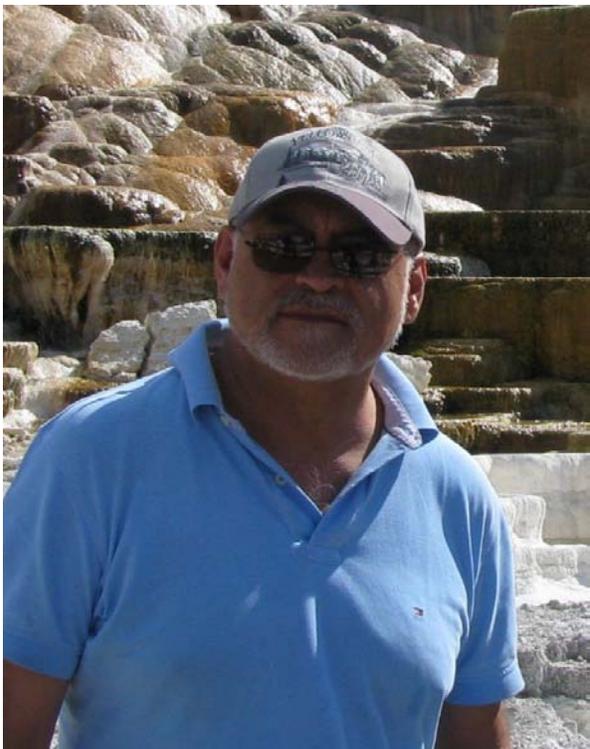
La abundancia de ignimbritas que resultaron de las grandes supererupciones en México ha dejado también su huella en el paisaje arquitectónico mexicano ya que estas rocas han sido frecuentemente utilizadas para construcciones y fachadas y se le conoce como cantera rosa. Las fachadas de las catedrales de Morelia, San Luis Potosí y Zacatecas, así como de la Iglesia de Santa Prisca en Taxco están construidas por este tipo de rocas. Las tonalidades rosas y rojizas de estas fachadas las adquirió la roca por la presencia de minerales de hierro oxidados. Algunas variedades de ignimbritas no soldadas tienen una baja dureza por lo que se usan para la fabricación de ornamentos y objetos decorativos. Existen también algunas variedades de cantera verde como las de la fachada del convento de Santo Domingo, en la Ciudad de Oaxaca. El color verde lo adquieren de minerales secundarios que se forman cuando la ignimbrita se encuentra en proceso de enfriamiento.

En síntesis, el extenso registro de ignimbritas y calderas en México, ofrecen una oportunidad a los grupos científicos para comprender en mayor detalle las características y los factores que generan las supererupciones.

Referencias

1. Newhall, Ch.G.; Self, S. (1982). *J. Geophys. Res.* 87, 1231–1238.
2. Lipman P. W. (1997). *Bull. Volc.* 59, 198-218.
3. Cole, J.W., Milner, D.M, Spinks, K.D. (2005) *Earth Sci. Rev.* 69, 1–26
4. Gathorne-Hardy, F. J., & Harcourt-Smith, W. E. H. (2003) *J. Hum. Evol.* 45, 227–230.
5. Chesner , C.A., Rose, W.I., Draker A.D.R., Westgate, J.A. (1991) *Geology* 19, 200–203
6. Christiansen, R. (2001). *The Quaternary and Pliocene Yellowstone Plateau Volcanic Field of Wyoming, Idaho, and Montana.* U. S. Geological Survey Professional Paper 729-G.
7. Ferrari, L. Valencia-Moreno, M y Bryan, S. (2005) *Bol. Soc. Geol. Mexicana* 57, 343-378.
8. Swanson, E.R. y McDowell, F.W., 1984. *J. Geophys. Res.* 89, 8787–8799.
9. Morán-Zenteno D.J., Alva Aldave, L.A., Solé, J, Iriondo, A. (2004) *J. Volc. Geotherm. Res.* 136, 97-119.

Semblanza del Dr. Dante Jaime Morán Zenteno



Es Ingeniero Geólogo egresado de la Facultad de Ingeniería. Realizó sus estudios de Maestría en Ciencias (Geología) y Doctorado en Geofísica en la UNAM. Su investigación doctoral la llevó a cabo en la Universidad de Munich con una beca del Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD). Obtuvo la Medalla Gabino Barreda por sus estudios de Maestría y mención honorífica por su tesis doctoral.

Es Investigador Titular “C” T.C., del Departamento de Geoquímica y miembro del Sistema Nacional de Investigadores (Nivel III). Su especialidad es la geoquímica y la petrología de los procesos magmáticos. Es además especialista en el estudio de la evolución geológica de México. Es profesor en las licenciaturas de Ingeniero Geólogo de la Facultad de Ingeniería y de Ciencias de la Tierra de la Facultad de Ciencias. Es además tutor del posgrado en Ciencias de la Tierra de la UNAM. Es autor o coautor de más de 50 artículo científicos, libros y capítulos de libros.

Ha sido Jefe del Departamento de Geología de la Facultad de Ingeniería, Director del Instituto de Geología y Coordinador del Consejo Académico del Área de Ciencias Físico Matemáticas y de las Ingenierías. Actualmente ocupa el cargo de Director de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM. Es además miembro de la Academia Mexicana de Ciencias, de la Academia de Ingeniería de México y *Fellow* de la Sociedad Geológica de América.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 129-139, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

POTENCIAL TERAPÉUTICO DEL FRAGMENTO C-TERMINAL DE LA TOXINA TETÁNICA

THERAPEUTIC POTENCIAL OF TETANUS TOXIN C-TERMINAL FRAGMENT

José Aguilera^{a,b}, Ana Candalija^a, Ana C. Calvo^c y Rosario Osta^c

^aInstitut de Neurociències y Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España.

^bCentro de Investigaciones Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) Barcelona, España.

^cLAGENBIO (Laboratorio de Genética y Bioquímica), Facultad de Veterinaria-13A, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS). Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 50013 Zaragoza, España.

Resumen

La toxina tetánica (TeTx), el agente causante de la enfermedad del tétanos, pertenece a la familia las neurotoxinas clostridiales (CNTs), reconocidas por poseer los agentes más venenosos de la naturaleza. La TeTx es una Zn²⁺-metaloendopeptidasa, que corta la proteína específica del complejo SNARE,

sinaptobrevina/VAMP. Como las neurotoxinas botulínicas, la TeTx es una nanomáquina modular compuesta por: una proteasa en su dominio *N*-Terminal; un canal proteico helicoidal central, que conduce la proteasa a través de la membrana del endosoma; y un dominio *C*-terminal de unión al receptor, consistente en dos subdominios que determina la unión específica a gangliósidos y a una proteína receptor en la superficie que marca la endocitosis. Han sido muchas las revisiones que se han publicado respecto a la estrategia neurotóxica de las CNTs. Sin embargo, nuestro propósito es revisar un aspecto nuevo, la capacidad neuroprotectora y reparadora de la TeTx. En su afán por tener éxito en llegar al SNC, la TeTx a través de su dominio *C*-terminal (H_C) ha ido evolutivamente adquiriendo las características de las neurotrofinas para unirse específicamente a los receptores de membrana sináptica de la neuronas motoras y sensitivas, provocar la invaginación de la membrana plasmática y penetrar en la célula en vesículas específicas, viajar retroaxonalmente y dar saltos transinápticos. Durante este proceso, los receptores Trks y $p75^{NTR}$, suelen ser sus acompañantes útiles, y a pesar de que el propósito biológico de la neurotoxina no es otro que llegar a sinapsis claves en la fisiología del animal intoxicado y producir la desconexión, y por lo tanto provocar la muerte, en el proceso no hay duda que el dominio H_C va ejerciendo efectos neurotróficos positivos, que nos daría una imagen similar a un “Caballo de Troya”. Nuestra propuesta final, una vez demostrado lo que indicamos, es que el fragmento recombinante rH_C , o bien el fragmento H_C separado por proteólisis y purificado, puede ser una alternativa terapéutica en muchas de la patologías neurodegenerativas y mentales que castigan duramente a nuestra sociedad, tales como la Enfermedad de Parkinson o la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson; Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA); Enfermedades neurodegenerativas; Neuroprotección; Neurotoxinas clostridiales (CNTs); Toxina tetánica (TeTx); Transducción de señal.

Abstract

Tetanus toxin (TeTx), the causative agent of tetanus disease, belongs to the clostridial neurotoxin (CNTs) family that are recognized as the most poisonous agents in nature. TeTx is a Zn^{2+} -metalloendopeptidase, which cleaves the specific SNARE protein, synaptobrevin/VAMP. As botulinum neurotoxins, TeTx is a modular nanomachine formed by a protease activity in the *N*-terminal domain; a central helical protein-conducting channel, which leads the protease across the

endosome; and a C-terminal receptor binding domain, consisting of two subdomains that determine target specificity by binding to a ganglioside and a protein receptor on the cell surface, triggering endocytosis. Many reviews have been published regarding the neurotoxic strategy of CNTs. However, our purpose is to review a new aspect, the neuroprotective and restorative capacity of TeTx. In its quest to succeed in reaching the CNS, the TeTx, through its C-terminal domain (H_C), has been evolve to acquired the characteristics of the neurotrophins to specifically bind to receptors on synaptic membrane of motor and sensitive neurons, cause the invagination of the plasma membrane and penetrate the cell-specific vesicles, traveling retroaxonally and jumped transynaptically. During this process, Trks and p75^{NTR}, usually its useful associated receptors and, although the biological purpose of the neurotoxin is simply to reach key synapses in the intoxicated animal and produce a shutdown causing death in the process, there is no doubt that the H_C domain exerts neurotrophic positive effects, which may be used as a "Troja Horse." Our proposal, if we demonstrates the ideas above indicated, is that the rH_C recombinant fragment or the H_C fragment separated and purified by proteolysis, can be a therapeutic alternative in many of the neurodegenerative and mental diseases harshly punish our society, such as Parkinson Disease or Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Key words: Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS); Clostridium neurotoxins (CNTs); Neurodegenerative diseases; Neuroprotection; Parkinson disease; Signal transducción; Tetanus toxin (TeTx).

Las Neurotoxinas Clostridiales

Las neurotoxinas clostridiales (CNTs) constituyen una familia de proteínas sintetizadas por diferentes especies del género *Clostridium*, especies anaeróbicas estrictas que comprometen toda su maquinaria celular en la síntesis de estas exotoxinas en la fase estacionaria previa a la esporulación. Se conocen siete isoformas de neurotoxinas botulínicas (BoNTs) y una única forma serológica de toxina tetánica (TeTx), todas ellas con una alta analogía y homología de secuencia [1-3]. La TeTx es sintetizada únicamente por la especie *C. tetani* y las demás CNTs (BoNT/A a BoNT/G) son sintetizadas por varias cepas de *C. botulinum*. Pero también, *C. butiricum* y *C. baratii* participan en la síntesis de BoNT/E y de BoNT/F, respectivamente, así como *C. argentinense* [4,5]

Las CNTs son sintetizadas como holoproteínas de unos 150 kDa (*single-*

chain, scCNT). Estas cadenas polipeptídicas son procesadas por endonucleasas bacterianas o del huésped, dando lugar a las neurotoxinas activas. Los productos de la hidrólisis están formados por dos cadenas, la cadena ligera (LC, *light-chain*) N-terminal de ~50 kDa y la cadena pesada (HC, *heavy-chain*) C-terminal de ~100 kDa; manteniéndose unidas por un puente disulfuro de cisteínas intercatenario [3,6-8].

A finales del siglo XX, Jongeneel y col. demostraron que las CNTs son hidrolasas, Zn²⁺-metaloproteasas poseedoras de la secuencia característica de coordinación al cinc (HExxH) [9,10]. Están especializadas en hidrolizar proteínas del complejo SNARE (*Soluble NSF-Attachment Proteins Receptor*) como la VAMP/sinaptobrevina, SNAP-25 y sintaxina [11,12]. La actividad enzimática hidrolítica recae en la cadena L, mientras que en la cadena H recaen las funciones de unión específica al tejido nervioso, su entrada al sistema nervioso y la facilitación de la translocación de la cadena L del lumen vesicular al citosol. Por lo tanto, las CNTs representan otro ejemplo de toxinas bacterianas del tipo A-B como la toxina colérica o la toxina diftérica.

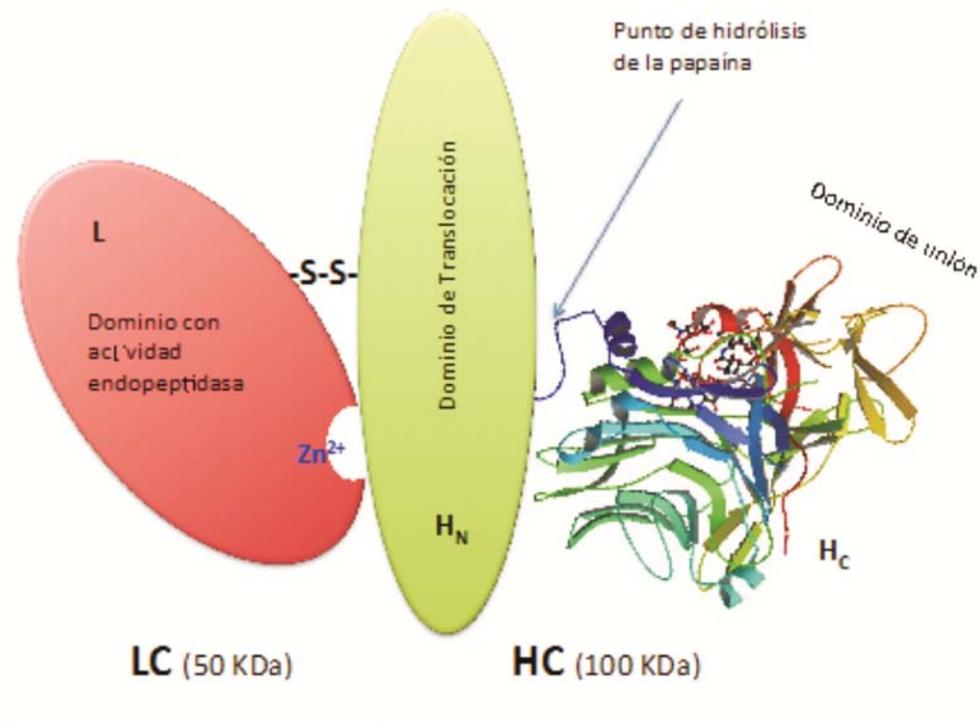


Figura 1. Diagrama de la molécula de la toxina tetánica (TeTx). La cadena pesada (HC) contiene los dominios de unión y translocación, mientras que el dominio catalítico está localizado en la cadena ligera (LC) de la molécula. La actividad catalítica es dependiente

de Zn^{2+} y el tratamiento con quelatos metálicos generan la apotoxina inactiva. En la Figura se indica la posición de corte de la endopeptidasa papaína cuya acción produce dos fragmentos el L-H_N de ~100 kDa, y el H_C de ~50 kDa, [14]. La estructura cristalina del dominio H_C ha sido resuelta y finamente estudiada [15]. Consiste en dos subdominios casi idéntico (25 kDa), el H_{CN} y el H_{CC}, este último posee dos sitios de unión a polisialogangliósidos que provocan la unión a una proteína que provocará la internalización y el transporte retroaxonal [16]. La nomenclatura de las neurotoxinas fue trabajada y fijada por 19 grupos en el *Fifth European Workshop on Bacterial Protein Toxins* (Veldhoven, Germany 1991) [17]. A las abreviaciones propuesta se tendrían que añadir el tipo de neurotoxina clostridial (CNT) en caso de un escrito que se aborde el estudio de más de una isoforma (p.ej.: L-TeTx o L-BoNT/A; H_C-TeTx o H_C-BoNT/B).

El mecanismo de acción de las CNTs es similar en todas ellas, la toxicidad se basa en la hidrólisis de proteínas del complejo SNARE responsable de la secreción vesicular, dando lugar a la inhibición de la fusión de las membranas vesiculares con la membrana plasmática y por lo tanto impidiendo la secreción del contenido vesicular. Según las células a las que tengan acceso, que dependerá de “*la puerta de entrada*”, se producirán unos u otros efectos fisiológicos, que son los responsables de las diferentes sintomatologías que encontramos entre las enfermedades de botulismo y de tétanos. El tétanos es una enfermedad grave que se caracteriza por contracciones musculares y espasmos recurrentes, mientras que el botulismo se manifiesta por un estado de parálisis flácida generalizada. La muerte en ambas patologías sobreviene generalmente por parálisis respiratoria [13].

La Toxina Tetánica

Centrando la atención en la TeTx, única responsable de la enfermedad del tétanos, es una proteína sintetizada por algunas cepas de *C. tetani*. Se da la paradoja, en esta toxina bacteriana, que la información genética se encuentra codificada en un plásmido [18], dentro de un procarionte que, a su vez, actúa sobre una célula eucariota de un organismo con sistema nervioso, con la función evolutiva de matar al organismo superior y convertirlo en un gran incubador anaeróbico, y continuar la expansión como especie anaeróbica estricta [13]. La bacteria, que se encuentra en forma de esporas de manera ubicua en el ambiente, sobre todo en regiones cálidas y en zonas agrícolas, entra en los animales o en el hombre a través de una herida poco oxigenada. Las colonias que de manera oportunista consiguen crecer lo hacen de manera discreta y sin producirse una

gran expansión, pero produciendo una cantidad de exotoxina suficiente para matar a su huésped. Se ha de considerar que la acción puede tener lugar en tejidos a concentraciones hipotéticas de 10^{-15} M.

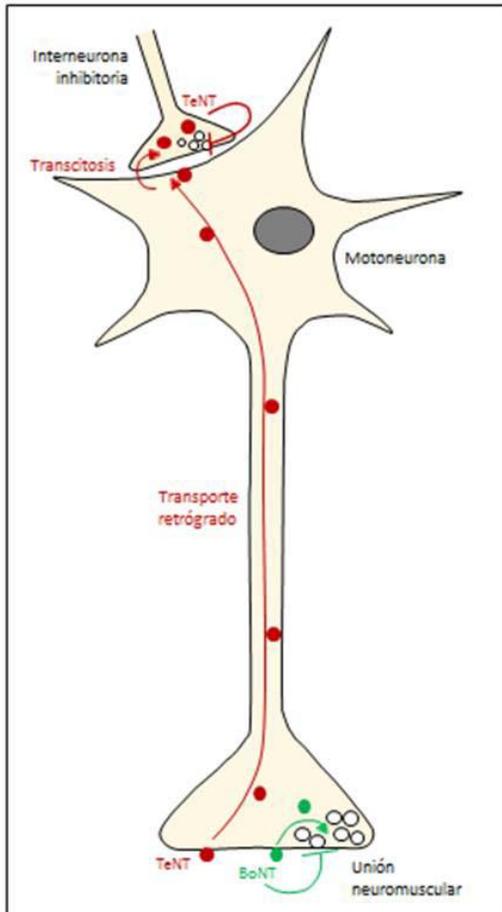


Figura 2. Fijación, captación y transporte retroaxonal de la toxina tetánica en comparación con las BoNTs. La TeTx o el fragmento H_C viaja retroaxonalmente con más eficacia que las otras CNTs. En el soma celular la TeTx produce salto transináptico (transcitosis) y fijación e inhibición de la liberación de las neuronas intercalares glicinérgicas o aquellas neuronas a las que tenga acceso.

La TeTx, a través del dominio C-terminal de la cadena pesada, se une con *alta afinidad* y *alta capacidad* a los di- y tri-sialogangliósidos específicos de las terminaciones nerviosas musculares y sensitivas, buscando así a sus receptores proteicos de *muy alta afinidad* y *baja capacidad* [19]. Esta unión cooperativa dará lugar a la entrada de la toxina por endocitosis en vesículas probablemente recubiertas de clatrina [20] aunque en este punto aún existe controversia. Dentro de las vesículas endocíticas, la TeTx activa la acidificación del lumen vesicular mediante las bombas de protones v-ATPasas y el dominio amino-terminal de la cadena H provoca la salida de la cadena L de las vesículas al citosol. En el citosol, la cadena L con actividad de hidrólisis peptídica específica hidrolizará la proteína

vesicular VAMP2/sinaptobrevina 2 (*vesicles-associated membrane protein2*) [21,22] y producirá la desconexión sináptica, que si es en una terminación neuromuscular provocará una parálisis flácida muscular (este efecto de inhibición neuromuscular es masivo en el botulismo, por lo que la sintomatología más manifiesta es una parálisis flácida generalizada).

Sin embargo, la TeTx entra en unas vesículas endocíticas que no producen translocación de la cadena L (o solo de manera discreta) en las terminaciones neuromusculares y que tienen como destino el transportarse retroaxonalmente al soma celular. En el soma celular las vesículas se fusionan con la membrana plasmática y la TeTx sale de nuevo al espacio extracelular buscando otra terminal sináptica que contenga los receptores adecuados [23]. Se ha observado que la TeTx entra activamente en las neuronas intercalares de la médula espinal, mediante vesículas endocíticas que facilitarán la translocación parcial de la cadena L, provocando así la inhibición de la liberación vesicular y por lo tanto, la liberación del neurotransmisor glicina [24,25]. Curiosamente, puesto que la glicina produce una acción de inhibición sobre las motoneuronas colinérgicas postsinápticas, el resultado es la *inhibición de la inhibición* y por lo tanto la motoneuronas quedan sin control, dando lugar a la parálisis espástica característica de la enfermedad del tétanos. La TeTx es capaz de producir varios saltos trans-sinápticos pudiendo llegar a niveles encefálicos; el insomnio y el estado de hiper-alerta observado en algunos enfermos podrían ser consecuencias de este comportamiento.

El Dominio C-Terminal de la Cadena Pesada de la Toxina Tetánica

Clásicamente se ha utilizado la cisteína endopeptidasa papaína (EC 3.4.22.2) para separar los dominios de las cadenas pesada amino-terminal y carboxilo-terminal, puesto que como hemos indicado participan en funciones diferentes en la estrategia de intoxicación [7]. La papaína produce un corte en la cadena H equidistante, produciendo dos fragmentos sin capacidad neurotóxica, el fragmento H_N y el fragmento H_C. En este capítulo vamos a desarrollar todas las acciones del dominio/fragmento H_C considerado el *Caballo de Troya* de la TeTx entera.

Se ha trabajado intensamente con el fragmento H_C en varios frentes:

1. Intentar averiguar los aceptores endógenos del sistema nervioso responsables de la captación por endocitosis de la TeTx por medio de su fragmento H_C.
2. Proponer su capacidad antigénica para sustituir la vacunación por medio del toxoide (TeTx atenuada por medio de formaldehido), puesto que el fragmento H_C no posee toxicidad.
3. Proponer al fragmento H_C como vehículo de transporte de sustancias que tuvieran que evadir la barrera hematoencefálica aprovechando su capacidad de transportarse por vía retrograda y producir saltos transinápticos.

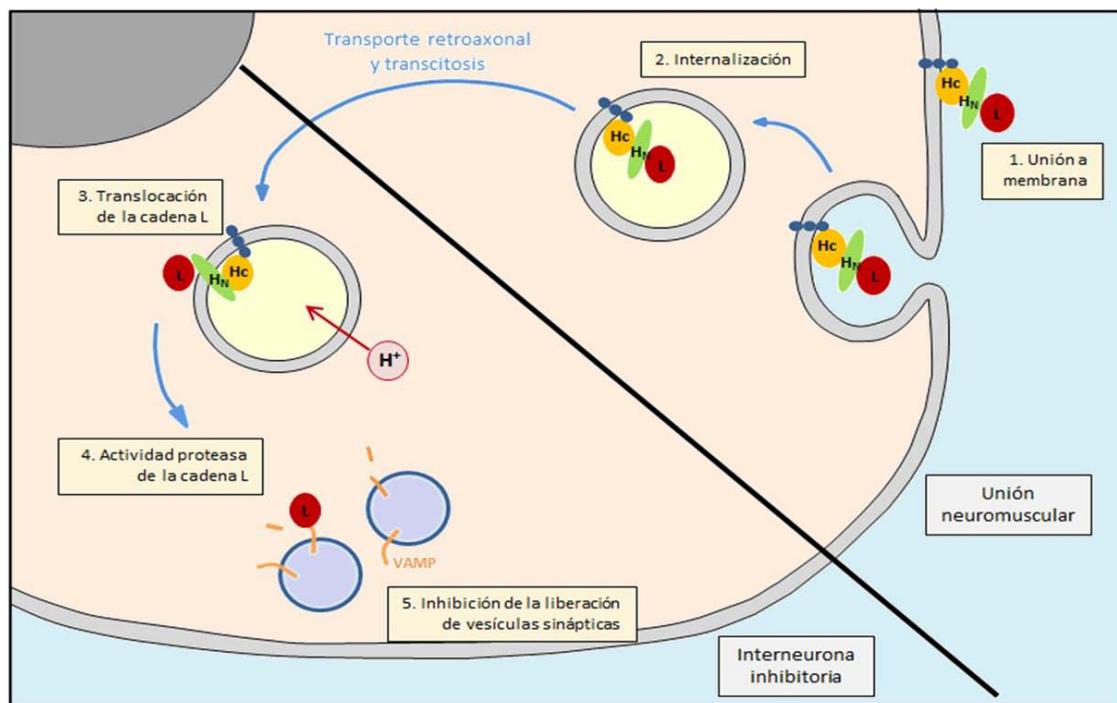


Figura 3. Esquema de actuación de las neurotoxinas clostridiales. La fijación a la membrana presináptica provoca la invaginación y entrada por endocitosis de la CNT, en el lumen vesicular puede producirse acidificación y translocación de la cadena L al citosol, donde actuará como hidrolasa sobre proteínas de complejo SNARE y por lo tanto produciendo las inhibición de la secreción vesicular; o bien, la vesícula endocítica viaja retroaxonalmente y produce uno o más saltos transinápticos.

En el presente trabajo se va a revisar estos aspectos ampliamente estudiados y aceptados, pero también un cuarto supuesto poco conocidos por la comunidad científica como son las propiedades neuroprotectoras, neurorreparadoras y proserotonérgicas del fragmento H_C de la TeTx [26].

Aceptores Endógenos del Fragmento H_C en el Sistema Nervioso

El elevado tropismo del la TeTx hacia el sistema nervioso ha dirigido a los investigadores durante más de un siglo a diferentes hipótesis, sin llegar a explicar todos los elementos de la unión altamente específica. La primera aproximación certera de estos elementos fue ofrecida por van Heyningen en 1959, que encontró en muestras de cerebro bovino que el ácido *N*-acetilneuroamínico (ácido siálico) contenido en los gangliósidos era esencial para la fijación de la TeTx a la sustancia gris del SNC [27-29]. Posteriormente, se evidenció la cooperación necesaria de elementos proteicos en los complejos de unión y de captación de la TeTx a través de su fragmento C-terminal [19]. Pero, a pesar de estos grandes hallazgos la identidad de los receptores proteicos permanece en controversia, si bien algunos grupos implican el reciclado de proteína vesicular SV2 (*synaptic vesicle protein 2*) como el receptor y el mecanismo de entrada a la vesícula sináptica [30-33].

Los *Lipid rafts* son microdominios lipídicos de la membrana plasmática enriquecidos en esfingolípidos (como los gangliósidos), colesterol y proteínas, muchas de ellas glicoproteínas ancladas a la membrana con glucosilfosfatidilinositol (*GPI-anchored proteins*). Los *Lipid rafts* representan las zonas altamente especializadas de la unión de la TeTx a las membranas presinápticas del sistema nervioso. La afinidad del fragmento H_C por los gangliósidos reside en los últimos 34 residuos aminoacídicos de la zona C-terminal [34]. Los gangliósidos del tipo GD1a y GT1b, pero no los monosialogangliósidos del tipo GM1, son los que ofrecen mayor afinidad en el proceso de unión [35]. Sin embargo, los gangliósidos no son los únicos aceptores de las TeTx, elementos proteicos son socios necesarios para la internalización. Schiavo y col. [36] han demostrado que una proteína GPI-anclada, Thy-1, podría ser candidata para la internalización, pero dada su ubicuidad y alta concentración en los microdominios lipídicos podría ser meramente una molécula estructural. El mismo Grupo encuentra el fragmento H_C asociado a vesículas de transporte positivas a Rab-7 y asociadas a los receptores neurotróficos p75^{NRT} y TrkB, dándoles ellos mismos más relevancia [37,38].

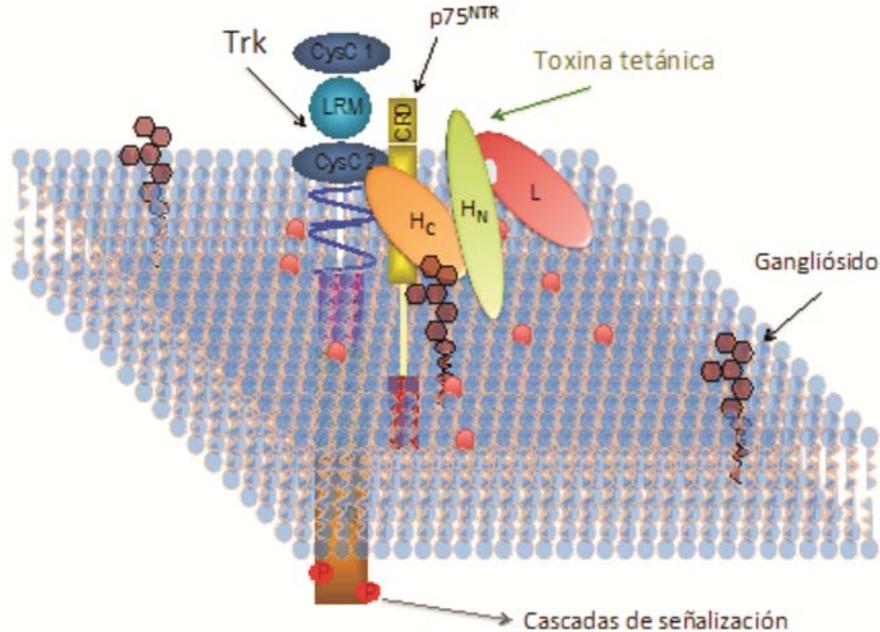


Figura 4. Esquema de un microdominio lipídico (*lipid raft*). La TeTx a través de su dominio C-terminal (H_C) se une con *alta afinidad* y *alta capacidad* a los poli-sialogangliósidos, GD1a y GT1b, densamente expresados en las membranas presinápticas, de esta manera la TeTx puede buscar en “dos dimensiones” a sus receptores de *muy alta afinidad* y *baja capacidad*, que probablemente son los receptores neurotróficos TrkA, TrkB, TrkC y $p75^{NTR}$ o bien estos son parte del complejo proteico necesario para la endocitosis. La unión a los receptores neurotróficos inducen cascadas de señalización y por lo tanto acciones a corto y largo plazo de adaptación [12,39,40].

La asociación de la TeTx y su fragmento H_C a los receptores neurotróficos, Trks y $p75^{NTR}$, ha sido sugerida reiteradamente por el Grupo de Aguilera y cols [39,49] dando pruebas suficientes de la cooperación necesaria para su fijación, captación y transporte retroaxonal. Estos resultados han sido también avalados por la identificación del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) como proteína receptora de la neurotoxina botulínica A (BoNT/A) a través de su fragmento C-terminal H_C/A [41]. El resultado de las interacciones y asociaciones con los receptores neurotróficos han propiciado la propuesta del fragmento sin toxicidad H_C de la TeTx como agente protector y reparador en algunas enfermedades neurodegenerativas y alteraciones mentales [12].

Fragmento H_C como Vehículo de Fármacos y Enzimas al SNC

Una de las características más relevantes de la TeTx, o de su fragmento H_C, es que puede transportarse retrógradamente y realizar saltos transinápticos hasta llegar a todas las áreas del SNC desde el sistema circulatorio o entérico [42-44]. Esta característica en el fragmento H_C abre la posibilidad, ya explorada, de utilizar el fragmento recombinante H_C (rH_C) como trazador de vías nerviosas. Además, se pueden construir quimeras proteína-H_C o ADN-H_C (o ARN-H_C) para hacer llegar las proteínas o el material genético al SNC sin necesidad de atravesar la barrera hematoencefálica, ya que tanto la TeTx como el fragmento rH_C la evaden.

Puesto que el fragmento rH_C de la TeTx puede representar un mecanismo no viral de transporte desde el sistema circulatorio (o desde otros sistemas de aplicación) al SNC, se han explorado la construcción de quimeras que pudieran ser fármacos en enfermedades neurodegenerativas [45]. Entre las quimeras más estudiadas encontramos BDNF-H_C y GDNF-H_C que ejercen una buena neuroprotección tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, GDNF-H_C promueve supervivencia neuronal y crecimiento neurítico en modelos animales de la Enfermedad de Parkinson [46] y en modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica [47,48]. BDNF-H_C también ejerció una acción neuroprotectora en un modelo de Esclerosis Lateral Amiotrófica, sin embargo no se encontró una acción sinérgica de esta quimera [49]. De manera similar, la cardiotrofina-1-H_C produjo aumento de interluquina 6 y la supervivencia de motoneuronas *in vitro*, efectos dosis dependientes [58]. También se evidenció la supervivencia celular y la acción antiapoptótica en la línea celular SH-SY5Y tratada con glutamato a concentraciones neurotóxicas al aplicar Bcl-X_L-H_C [51], efecto que se debería probar demostrando que la proteína Bcl-X_L es capaz de salir de la vesícula endocítica para ejercer su acción en el citosol o quizás deberíamos responsabilizar de la acción de protección a la acción promotora de la supervivencia del fragmento H_C [12]. Aumentar los niveles de Cu²⁺/Zn²⁺ superóxido dismutasa 1 (SOD1) muestra ser eficaz en modelos de ictus y de Enfermedad de Parkinson, la quimera SOD1-H_C fue tan eficaz como el fragmento H_C a la hora de transportarse retrógradamente y producir saltos transinápticos [52].

No obstante, en todos estos trabajos lo que se demuestra es que el fragmento rH_C es un buen transportador de proteínas al SNC, pero no que las proteínas se encuentren totalmente disponibles para ejercer su acción fisiológica celular. También se ha demostrado que la quimera es más efectiva transportando cuando ocupa la posición carboxilo-terminal, posición natural en la TeTx completa.

En este trabajo daremos referencias de que los efectos neurotróficos son producidos, sobretodo por el vehículo propuesto, rH_C, siendo a la vez vehículo y principio activo neuroprotector.

Receptores y Vías de Señalización del Fragmento H_C de la Toxina Tetánica

La TeTx comparte con las neurotrofinas sus receptores específicos de *muy alta* afinidad Trk (*tropomyosin-related kinase*) y su receptor común p75^{NTR}. El NGF (*nerve growth factor*) tiene afinidad por el receptor TrkA, el BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) y la neurotrofina-4/5 por TrkB y la neurotrofina-3 por TrkC. Todas las neurotrofinas tienen afinidad por el receptor p75^{NTR}, pero especialmente tienen afinidad por el p75^{NTR} cada una de las pro-neurotrofinas. A las neurotrofinas se les ha relacionado con el control de la función sináptica y la plasticidad; la regulación de la supervivencia celular, su morfología y diferenciación; así como la regulación de aspectos funcionales de las neuronas en los sistemas nerviosos central y periférico a través de sus receptores Trk formando homodímeros, o heterodímeros en cooperación con el p75^{NTR} [53,54]. Las interacciones de p75^{NTR} con las pro-neurotrofinas pueden dar lugar a señalizaciones más complejas y a veces opuestas [55-57]; la asociación de p75^{NTR} a las pro-neurotrofinas pueden crear asociaciones con NogoR y Lingo-1, asociación que produce inhibición del crecimiento neurítico a través de la activación de RhoA [58,59]; La asociación con Sortilina provoca muerte celular [60].

El Grupo de Aguilera y cols describieron que la TeTx produce translocación, activación y *down-regulation* de proteínas quinasas C (PKC) *clásicas* y *nuevas* [61,62]. Estas activaciones son debidas a los aumentos de diacilglicerol, IP₃ y Ca²⁺ provocados por la hidrólisis de los fosfatidilinositol-fosfatos (PIP₂) por la fosfolipasa C γ -1 (PLC γ -1) [62,63]. Igualmente la PLC γ -1 es fosforilada en tirosinas por los receptores Trks, translocada a la membrana plasmática y activada su cinética hidrolítica. Esta acción es consecuencia de la autofosforilación de los receptores Trks por acción del la TeTx a través de su dominio C-terminal H_C [39,40,64].

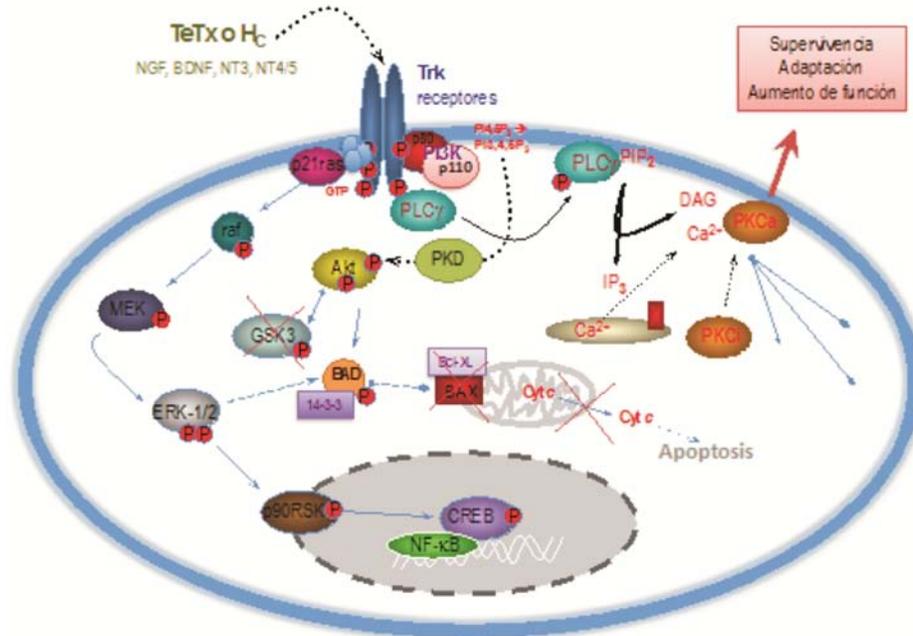


Figura 5. Representación de la principales proteínas impladas en las vías de señalización ligadas a los receptores neurotróficos Trk con actividad tirosina quinasa y potenciadas o inhibidas por la TeTx o su fragmento H_c. Además de la vía mostrada en la figura anterior la vía PLCγ/PKC, se muestra las vías p21ras/ERK y PI3K/Akt. Ambas actúan inhibiendo la vía intrínseca de apoptosis impidiendo entre otras acciones la formación de poros mitocondriales y la liberación de citocromo c (Cyt c). Entre los múltiples procesos en los que interfieren estas vías destacan su acción a largo plazo a través de factores de transcripción tales como CREB y NF-κB [39,40,64].

De manera más amplia, a parte de la acción neurotóxica, la TeTx se encuentra implicada en la modulación de señales intracelulares, activando varias vías de señalización intracelular como son: la vía fosfolipasa Cγ-1 (PLCγ-1)/proteína quinasa C (PKC), la vía p21ras/ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*; también denominada *MAPK: mitogen-activated protein kinsase 1/2*) y la vía PI3K/Akt, entre otras. Todas estas actividades también se producen a través de la activación de los receptores de membrana Trks con actividad tirosina quinasa [39,64,65]. Se desconoce cuál es el papel de esta modulación en la intoxicación tetánica, aunque podría participar de manera importante en los procesos de fijación, captación y transporte retroaxonal de la toxina clostridial. Se ha demostrado que estos efectos son mediados por el dominio C-terminal o fragmento H_c. En la Figura 5, se indican los elementos claves de cada una de las vías de transducción señaladas, observándose que algunos elementos están: fosforilados, translocados a la membrana plasmática, poseen actividad catalítica

aumentada, o bien posterior al proceso de activación/fosforilación se produce *down-regulation* como se ha observado en los receptores Trks [54] o en algunas isoformas de PKC [61,65].

Los receptores Trks han sido descritos como responsables de la inducción de supervivencia celular en respuesta a sus agonistas endógenos, las neurotrofinas. En el esquema que presentamos (Figura 5) se observa la fosforilación/activación del Trk por rH_C (o por la TeTx), acción compartida por las neurotrofinas, NGF y BDNF por ejemplo. La activación ha sido observada tanto para TrkA como TrkB, y trabajos preliminares también indican la activación de TrkC.

Capacidad Inmunológica del Fragmento rH_C

La práctica de la inmunización pasiva, si bien puede ser una solución cuando aparecen los primeros síntomas de la enfermedad tetánica su práctica es escasa, ya que la extracción de suero de voluntarios humanos inmunizados es cara y limitada. La utilización de antitoxina equina es más asequible pero implica alto riesgo de reacciones anafilácticas [67]. Una buena solución podría ser la puesta a punto y fabricación de inmunoglobulina humanas por bioingeniería. El tratamiento de la TeTx con formaldehído convierte a la toxina en un toxoide con alta eficacia como vacuna antitetánica [68,69]. La vacuna basada en el toxoide es un producto altamente comercializado, económico y seguro; confiere alta inmunización y protección a largo plazo. Además, parece producir una acción inmediata de bloqueo de los sitios de unión de la TeTx (polisialogangliósidos) que posibilitan la competencia de la fijación y captación por el tejido nervioso [67]. Pero a pesar de que el fragmento recombinante rH_C está siendo estudiado intensamente no haya habido una propuesta comercial de su uso farmacológico como agente de inmunización activa contra la enfermedad de tétanos, ya que sería aún más seguro y no necesitaría modificarse.

La presencia de zonas antigénicas han sido descritas en muchos trabajos pero las conclusiones no son concluyentes, quizás debido a que si bien posee zonas antigénicas, estas no sean suficientemente activas para producir una correcta protección a dosis terapéuticas. Pero, hay controversias respecto a su eficacia, la expresión de rH_C en cloroplastos de la planta del tabaco, representa una solución económica a la fabricación de vacunas antitetánicas. Una primera tentativa ha sido la inmunización activa por vía nasal, sin necesidad de

coadyuvantes, con este producto recombinante, dando resultados al parecer positivos [70].

Resultados recientes parecen indicar que una dosis única de citomegalovirus codificante para el fragmento rH_C induce niveles de anticuerpos anti-TeTx perdurables en el tiempo (más de 13 meses en ratones inmunizados). Esta estrategia podría ser comercialmente sostenible en países subdesarrollados donde el tétanos representa el 1% de la mortalidad infantil [71] y donde se necesitan fármacos asequibles económicamente. Sin embargo, esta técnica no garantiza una expresión homogénea del fragmento rH_C en toda la población y podrían existir casos en la que una expresión excesiva provocase efectos colaterales. El uso del fragmento recombinante podría ser una estrategia menos arriesgada puesto que podemos controlar mejor la dosificación. No obstante, dada sus características neurotróficas su uso como vacuna podría conferir sintomatologías que se deberían estudiar.

Acción Pro-Serotoninérgica de la Toxina Tetánica

Aunque la acción sobre los receptores Trk del fragmento H_C (o de la TeTx) se ha observado en diferentes sistemas, es en el sistema serotoninérgico donde se ha encontrado un significado más evidente; las cPKC fosforilan específicamente el transportador de serotonina modulando negativamente su transporte [65,72,73]. La modulación es fisiológica manteniendo la inhibición con similar efectividad que los inhibidores selectivos del transporte de serotonina (SSRI) como la imipramina, fluoxetina o paroxetina, e incluso con dosis 10³-10⁴ veces inferiores [65]. Simultáneamente, se produce un aumento de síntesis de serotonina por activación de su enzima de síntesis la triptófano hidroxilasa (EC 1.14.16.4) [74], ambas actividades están relacionadas con una acción plenamente pro-serotoninérgica.

Es curioso que la inhibición de la captación específica de neurotransmisores por acción de las CNTs se estudió durante los años 80 del siglo XX sin que se le diera relevancia, quizás debido a que no representaba una acción clara sobre la toxicidad y la muerte del animal intoxicado. Pero los resultados fueron claros, la captación de glicina y GABA es inhibida por la TeTx mientras que este fenómeno no se observa con la BoNT/A [75]. La TeTx también inhibe la captación de colina en un 40% siendo 10 veces más potente que la BoNT/A [76]. Tuvieron que pasar dos décadas para que Aguilera y cols retomaran el tema y dieran un significado

dentro de los mecanismos de acción de las neurotoxinas [65,72,73]. Además de hacer responsable de la acción de la inhibición de la captación al dominio C-terminal, fueron las primeras pistas, junto a la acción sobre la proteína quinasa C (PKC) [61,70,77], de la acción de las CNTs sobre los sistemas de transducción de señal intracelulares.

Tal como hemos indicado, las acciones pro-serotoninérgicas tienen su origen en la activación de los receptores neurotróficos, y el fragmento H_C induce la fosforilación de todos ellos (TrkA, TrkB, TrkC y p75^{NTR}). Sin embargo, esto no indica que su acción *in vivo* tenga que ser idéntica a cada una de las neurotrofinas puesto que se diferencian todas ellas en afinidad y especificidad, expresando cada familia celular diferentes patrones de receptores. Así se ha observado que la acción de NGF en sinaptosomas encefálicos de rata es contraria a la de la TeTx, produciendo la neurotrofina un aumento significativo del transporte de serotonina [63,78].

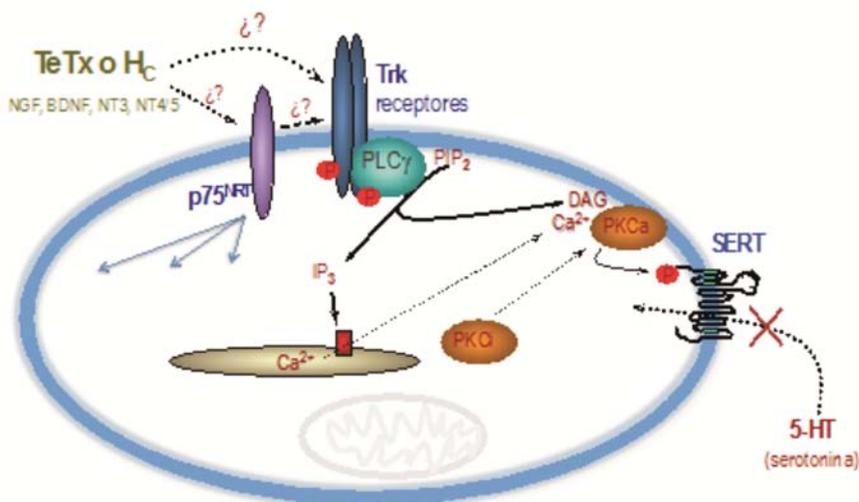


Figura 6. La toxina tetánica a través de su dominio C-terminal (H_C) o bien el fragmento recombinante rH_C, interacciona con los receptores neurotróficos con actividad tirosina quinasa (TrkA, TrkB, TrkC) provocando su autofosforilación. A su vez los receptores fijan, a través de su dominio SHc, a la fosfolipasa γ -1 (PLC γ -1) fosforilándola, translocándola y activando su capacidad hidrolítica sobre los fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatos [65,72,73]. Los productos de la PLC γ -1 son el diacilglicerol (DAG) y el Inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), el IP₃ interacciona con sus receptores en las vesículas llenas de Calcio y lo libera al citosol. Ambos segundos mensajeros, DAG y Ca²⁺, translocan y activan las proteínas quinasas de dependientes de Ca²⁺ y fosfolípidos clásicas (cPKC) que entre otros efectores fosforilan reversiblemente el transportador específico de la serotonina (SERT). A diferencia de las fosforilaciones activadoras de otras quinasas como la CaMK2 o la PKG, las cPKC producen inhibición de la captación de serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) produciendo una acción pro-serotoninérgica [79].

Muchas son las ventajas de la acción pro-serotoninérgica del fragmento atóxico rH_C en comparación a otros fármacos que producen una acción demostrada de inhibición específica de los transportadores de serotonina (SSRIs) en un hipotético uso farmacológico:

- a. El fragmento rH_C puede ser aplicado periféricamente (p. ej., intramuscular).
- b. Posee un elevado tropismo por el SNC, especialmente sobre la membrana presináptica.
- c. Tiene una vida media elevada por lo que la dosis puede espaciarse de 2 a 4 semanas.
- d. No se han observado efectos colaterales a dosis terapéuticas en animales de experimentación.
- e. El fragmento rH_C [IC₅₀ = 8,7 ± 1,0 nM], es varios órdenes de magnitud más potente que los inhibidores SSRIs, la imipramina [IC₅₀ = 11,9 ± 0,9 μM], la fluoxetina [IC₅₀ = 33,5 ± 0,1 μM], o la paroxetina [IC₅₀ = 89,9 ± 5,7 μM] en su acción bloqueadora del transporte de serotonina [72].

Todas estas propiedades pueden ser positivas en el tratamiento de alteraciones o patologías mentales, siendo su tratamiento más suave y fisiológico puesto que no se encuentra una inhibición total, ni la disminución del número de transportadores.

Potencial Terapéutico del Fragmento rH_C en Enfermedades Neurodegenerativas

El fragmento rH_C se ha utilizado para monitorizar el transporte retroaxonal *in vivo* en modelos animales de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) en estados pre-sintomáticos para estudiar su capacidad como biomarcador de la enfermedad [80]. Una menor capacidad de la llegada del marcador a los cuerpos (somas) de las motoneuronas de la médula espinal, tras una inyección intramuscular, indicaría una afectación que sería inversamente proporcional a la gravedad de la alteración (p. ej.: Alexa-rH_C, en experimentación animal).

Trabajos preliminares del Grupo de Daniel I. Limón, indican cómo la aplicación del fragmento rH_C en animales tratados con el fragmento neurotóxicos β-amiloide de 11 aminoácidos, βA₂₅₋₃₅, en el hipocampo, evita la pérdida de

memoria espacial en el laberinto de Morris, protege la degeneración neuronal de la Capa C1 del hipocampo y protege la integridad tisular reduciendo la reactividad de los astrocitos y reduciendo al máximo la activación de caspasa 3, *in vivo* [81,82]. En el mismo sentido nuestro Grupo observa resultados similares con el tratamiento crónico con el modelo de animal transgénico de la Enfermedad de Alzheimer, APP_{Sw,Ind.}. En estos experimentos preliminares se observó el mantenimiento de la capacidad de aprendizaje en el laberinto de Morris del grupo transgénico tratado con rH_C, a nivel de animal Control (WT). Resultados significativos de mantenimiento de la viabilidad celular se observaron también en cultivos primarios de neuronas corticales tratadas con rH_C [83]. Todas estas pruebas indicarían que el fragmento rH_C podría representar un tratamiento preventivo en la Enfermedad de Alzheimer. La esperanza que pronto tengamos marcadores que nos avance la aparición de la enfermedad hará más atractivo el tratamiento con rH_C por su acción preventiva. Sin embargo, aún avanzada la enfermedad el fragmento rH_C conseguiría frenarla y, en parte, aliviar algunos síntomas.

Como se ha indicado el fragmento rH_C podría representar una solución global de muchas enfermedades neurodegenerativas y alteraciones mentales, pero hay dos enfermedades en las que el uso del fragmento rH_C ha sido patentado [84,85] y que podría ser ya una realidad terapéutica, la Enfermedad de Parkinson y la Esclerosis Lateral Amiotrófica, por lo que a continuación se tratarán con algo más de extensión.

El Fragmento rH_C en la Enfermedad de Parkinson

Se ha avanzado que el fragmento rH_C protege a las neuronas granulares de cerebelo (CGN) frente a la muerte apoptótica provocada por la disminución $[K^+]_e$ y que en esta protección están implicadas las vías de transducción de la señal, PI3K/Akt y p21ras/MAPK. [86]. Mediante tinción nuclear con DAPI se observa como las neuronas granulares de cerebelo (CGN) no entran en el proceso de condensación nuclear, proceso considerado como indicativo de muerte apoptótica. Las CGN son más resistentes a la acción de ioduro de 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) desencadenante de la muerte celular, si co-aplicamos el neurotóxico con el fragmento rH_C [87].

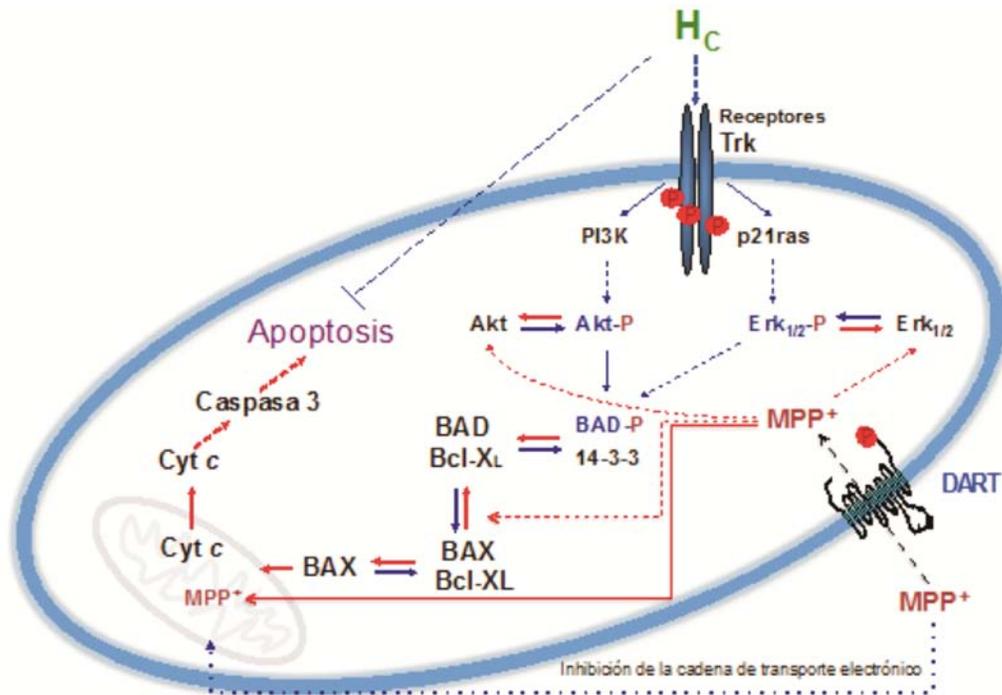


Figura 7. El fragmento recombinante rH_C induce la supervivencia de las neuronas granulares de cerebelo cuando se encuentran sometidas a condiciones de estrés inductor de apoptosis, como se ha demostrado con la intoxicación con 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) que es captado por los transportadores de dopamina (DART). A través de las vías de señalización PI3K/Akt y p21ras/ERK, la fosforilación de BAD impide la formación de los poros de membrana mitocondrial de BAX al liberar la chaperona anti-apoptótica Bcl-X_L, que bloquean la formación del poro de BAX. Aunque el estrés sea de causas diferentes: MPP⁺, privación de potasio (5 mM) o de suero, etc., al impedir la liberación de citocromo c, impide la vía apoptótica. Las neuronas en cultivo o en tejidos más o menos íntegros aumentarán la probabilidad de supervivencia hasta la desaparición del estrés [86,87].

La protección se produce por la capacidad del fragmento recombinante rH_C de activar varias vías de transducción, produciendo entre otros efectos, la fosforilación de Bad (*Bcl-2-associated death promoted*), sustrato de la quinasa Akt/PKB, y la pérdida de afinidad por la proteína chaperona Bcl-X_L (*B-cell lymphoma-extra large*) a favor de la proteína chaperona 14-3-3. La proteína Bcl-X_L adquiere afinidad por la proteína pro-apoptótica Bax (*Bcl-2-associated X protein*), y Bax deja de favorecer la liberación de citocromo c (Cyt c). La liberación de Cyt c se produce como señal del estrés energético producido por la neurotoxina MPP⁺ al inhibir el complejo I de la fosforilación oxidativa. Pero, en el tratamiento con rH_C no es liberado por el secuestro reversible de Bax por Bcl-X_L [87]. En las células

controles, y en las tratadas con rH_C se observa que el Cytc está localizado principalmente en mitocondria y la proteína Bax en citosol. El tratamiento de las células CGN en cultivo con MPP⁺ provoca la translocación de Bax a la membrana mitocondrial y la salida de Cytc de la mitocondria [88]. El tratamiento simultáneo con MPP⁺ y rH_C produce la reversión del sistema a la situación del grupo control. La liberación de Cytc produce indirectamente la hidrólisis/activación de las proteasas responsables de la muerte celular, las caspasas [89], activación que se revierte, en parte, con la co-aplicación de MPP⁺ y rH_C.

Es evidente que los neurotóxicos, MPTP, MPP⁺ y 6-OHDA, no reproducen de manera exacta la Enfermedad de Parkinson, pero son unas de las herramientas que, de manera experimental, nos aproximan a ella. Mendieta y cols, han demostrado extensamente *in vivo* la bondad del fragmento rH_C en estos modelos, tanto con la aplicación intracraneal, como con la aplicación periférica [90,91]. Los animales conservaron no solo la integridad tisular encefálica, sino que además no perdieron la capacidad motora en los modelos ipsilaterales.

El Fragmento rH_C en la Esclerosis Lateral Amiotrófica

La situación de las enfermedades neurodegenerativas minoritarias o raras como la Atrofia Muscular Espinal (SMA), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) o la Enfermedad de Huntington (HD), entre otras, es preocupante. En ninguna de estas patologías existen estrategias terapéuticas específicas, ni fármacos que aminoren la sintomatología o la esperanza de vida, por lo que la inyección intramuscular del fragmento C-terminal de la TeTx como proteína recombinante, rH_C, o bien como ADN desnudo codificante para dicho fragmento, pueden paliar o retrasar la progresión de estas enfermedades.

La ELA es una alteración neurodegenerativa progresiva de las neuronas motoras. Generalmente es fatal entre 1 y 5 años de su aparición sintomática y con una prevalencia cercana a 3 personas por cada 100.000 habitantes con un factor de riesgo con la edad a partir de los 60 años [92]. El 5-10% de los pacientes presentan forma de la ELA familiar ligada a mutaciones genéticas que se encuentran, principalmente, en el gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa cobre-cinc 1 (SOD1) (~20% del total), aunque también se han encontrado mutaciones en los genes que codifican para la alsina, la senataxina, la proteína B asociada a membranas vesiculares (VAPB) y la proteína de unión a DNA/RNA TDP43 (~4% del total) entre otros. Recientemente, se ha descrito la existencia de expansión de una secuencia hexanucleótido en la región no

codificante de C9ORF72 [93,94], tanto en casos familiares como esporádicos de ELA. Sin embargo, la etiopatogenia de la ELA continúa siendo desconocida. Sea por causas familiares o por cuestiones de neurotoxicidad por glutamato, superproducción de radicales libres, etc.

La alternativa terapéutica con riluzol, después de dos décadas y más de 30 ensayos clínicos no ha tenido éxito [95], la discrepancia entre los resultados con modelos animales y su translación a humanos podría indicarnos que los modelos no se ajustan debidamente. Quizás tendríamos que estudiar más a fondo las formas esporádicas de la enfermedad y aceptar sus características de afectación a diversos procesos fisiopatológicos [96]. En este sentido Puesto que el fragmento rH_C ha demostrado actuar fortaleciendo a las motoneuronas, el tratamiento antes de la lesión, durante o después, ha demostrado gran eficacia neuroprotectora tanto *in vivo* como *in vitro* [97]. Estos resultados beneficiosos del fragmento rH_C, frente diferentes estrés celulares podría abarcar a más sistemas y demostrar mejor eficacia terapéutica en el hombre.

En este sentido ya hemos indicado que el fragmento rH_C puede ser útil para diagnosticar una alteración motora mediante la capacidad del transporte axonal [80]. Pero, también el uso de ADN desnudo de H_C aumentó la supervivencias de los animales transgénicos SOD1^{G93A}, un modelo murino aceptado de ELA que expresa una mutación de la superóxido dismutasa 1 (EC 1.15.1.1) humana [98]. La aplicación del tratamiento produjo un aumento de la supervivencia de las motoneuronas espinales, la activación de señales de supervivencia y la inhibición de señales de apoptosis (fosforilación de Akt y *down-regulation* de caspasa 3, respectivamente) [98]. Sin embargo, el tratamiento de los ratones SOD1^{G93A} con el ADN desnudo quimérico BDNF-H_C y GDNF-H_C no mostraron mayor eficacia que el ADN de H_C en solitario en estos modelos por lo que la respuesta terapéutica podría ser redundante [47-49,99].

Resultados recientes *in vitro* indican que el tratamiento con rH_C aumenta la supervivencia de la motoneuronas de la médula espinal frente a daños excitotóxicos (incluso después dos horas de la lesión). En este intervalo, encontramos que las vías de señalización p44/p42 MAP quinasas (ERK1/2) y la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3β) juegan un papel relevante en el efecto neuroprotector. Estas vías son responsables de la autofagia reparativa observada y parecen indicar que la protección es inmediatamente después de la injuria tisular o bien durante la fase secundaria que se inicia después del trauma en la médula espinal [97]. En este sentido, las pruebas preclínicas del potencial fármaco están

siendo positivas frente a esta patología en el modelo *in vivo* SOD1^{G93A} y esperamos que pronto se inicien las esperanzadoras pruebas clínicas.

Este último año, también ha sido demostrado en un modelo animal de isquemia global que el fragmento H_C de la TeTx resulta neuroprotector en diferentes núcleos del SNC tras su aplicación intramuscular [99].

Finalmente, dos preguntas quedan siempre en las discusiones de la acción terapéutica del fragmento rH_C. La primera, es si sería efectiva en pacientes que han desarrollado inmunización activa por vacunación; la respuesta la hace evidente el Grupo de Fairweather y cols que demuestran claramente que aún poseyendo los animales inmunización activa no se aprecia disminución de la fijación, ni del transporte retroaxonal de rH_C [100] y siendo las cantidades necesaria para provocar la acción terapéutica ínfimas continuaría actuando adecuadamente. La segunda pregunta es, si la accesibilidad del fragmento rH_C a los sitios afectados del SNC está garantizada, esta pregunta ha venido siendo contestada y contrastada reiteradamente [42-45]. El fragmento rH_C, igual que la TeTx, podría acceder retroaxonalmente a cualquier área del SNC por vía retroaxonal y salto trans-sináptico, para cada patología o tratamiento se tendrá que estudiar la mejor vía de administración.

Conclusión

La toxina tetánica, a través de su dominio C-terminal, interacciona directa o indirectamente con los receptores de las neurotrofinas TrkA, TrkB, TrkC y p75^{NTR}, actuando como agente neurotrófico. En su estrategia de invasión la TeTx utiliza los sistemas de los factores de crecimiento para fijarse, captarse, viajar retroaxonalmente y realizar saltos transinápticos que le permitan acceder a niveles superiores del SNC. En su estrategia de suplantación de las neurotrofinas utiliza a los receptores como acompañantes necesarios y los activa, lo que provoca respuestas en las cascadas de señalización específicas para cada célula aceptora, dando lugar a modificaciones fisiológicas, a corto y largo plazo, encargadas generalmente de producir una mayor adaptación de las células y los tejidos al estrés ambiental o a los agentes neurotóxicos. Por lo tanto, el fragmento rH_C, como dominio responsable, ha demostrado ser un potencial agente terapéutico al ser una sustancia atóxica, capaz de acceder eficazmente al SNC, tener una vida media larga y actuar como sustancia neuroprotectora y neurorreparadora. Tanto *in vitro* como *in vivo*, el fragmento rH_C protege los cultivos

primarios de neuronas frente a importantes neurotóxicos como el MPP⁺ o el Glutamato a dosis elevadas; o bien reduce la sintomatología en modelos de enfermedades como en la Enfermedad de Parkinson (con MPP⁺ o con 6-OHDA) o en la Esclerosis Lateral Amiotrófica. El fragmento rH_C, a través de su acción pro-serotoninérgica, puede también actuar positivamente en alteraciones mentales, y puesto que las alteraciones mentales como las enfermedades neurodegenerativas suelen poseer sintomatologías y degeneración compartidas, un fármaco con esta capacidad dual podría ser una gran solución terapéutica.

Bibliografía

1. Johnson, J.L. y Francis, G. (1975) *J. Gen. Microbiol.*, 88, 229–44
2. Eisel, U., Jarausch, W., Goretzki, K., Henschen, A., Engels, J., Weller, U., Hudel, M., Habermann, E. y Niemann, H. (1986) *EMBO J.*, 5, 2495-502
3. Johnson, E.A. (1999) *Annu. Rev. Microbiol.*, 53, 551–75
4. McCroskey, L.M., Hatheway, C.L., Fenicia, L., Pasolini, B. y Aureli, P. (1986) *J. Clin. Microbiol.*, 23, 201-202
5. McCroskey, L.M., Hatheway, C.L., Woodruff, B.A., Greenberg, J.A. y Jurgenson, P. (1991) *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2618-2620
6. Bizzini, B. (1979) *Microbiol. Rev.*, 43, 224-40
7. Helting, T.B. y Zwisler, O. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 187-93
8. Krieglstein, K., Weller, U., Henschen, A. y Habermann, E. (1990) *Eur. J. Biochem.*, 188, 39-45
9. Jongeneel, V., Bouvier, J. y Bairoch, A. (1989) *FEBS Lett.*, 242, 211-4
10. Fairweather, N.F. y Lyness, V.A. (1986) *Nucleic Acids Res.*, 14, 7809-12
11. Ungar, D. y Hughson, F.M. (2003) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 19, 493–517
12. Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N.J. y Poulain, B. (2000) *Biochimie*, 82, 427-46
13. Aguilera, J., Niemann, H. y Blasi, J. (2003) *Patología Molecular*, Editorial Masson. Cap., 20, 39-673
14. Neubauer, V. y Helting, T.B. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 141–8
15. Umland, T.C., Wingert, L.M., Swaminathan, S., Furey, W.F., Schmidt, J.J. y Sax, M., (1997) *Nat. Struct. Biol.*, 4, 788–92
16. Jayaraman, S., Eswaramoorthy, S., Kumaran, D. y Swaminathan, S., (2005) *Proteins*, 61, 288–95
17. Aguilera, J. y otros (1992) *FEMS Microbiol. Lett.*, 90, 99-100
18. Bruggemann, H., Baumer, S., Fricke, W.F., Wiezer, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, C., Martinez-Arias, R., Merkl, R., Henne, A. y Gottschalk, G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 1316–21
19. Yavin, E. y Nathan, A. (1986) *Eur. J. Biochem.*, 154, 403-7
20. Parton, R.G., Ockleford, C.D. y Critchley, D.R. (1987) *J. Neurochem.*, 49, 1057-68

21. Schiavo, G., Rossetto, O., Santucci, A., DasGupta, B.R. y Montecucco, C. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 23479-83
22. Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R. y Montecucco, C. (1992) *Nature*, 359, 832-5
23. Schwab, M.E., Suda, K. y Thoenen, H. (1979) *J. Cell Biol.*, 82, 798-10
24. Curtis, D.R. y De Groat, W.C. (1968) *Brain Res.*, 10, 208-12
25. Miana-Mena, F.J., Roux, S., Benichou, J.C., Osta, R. y Brûlet, P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 3234-9
26. Calvo, A.C., Oliván, S., Manzano, R., Zaragoza, P., Aguilera, J. y Osta, R. (2012) *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 6883-901
27. van Heyningen, W.E. (1959a) *J. Gen. Microbiol.*, 20, 291-300
28. van Heyningen, W.E. (1959b) *J. Gen. Microbiol.*, 20, 301-9
29. van Heyningen, W.E. (1959c) *J. Gen. Microbiol.*, 20, 310-20
30. Yeh, F.L., Dong, M., Yao, J., Tepp, W.H., Lin, G., Johnson, E.A. y Chapman, E.R. (2010) *PLoS Pathog.* Nov 24;6(11):e1001207
31. Blum, F.C., Chen, C., Kroken, A.R. y Barbieri, J.T. (2012) *Infect. Immun.*, 80, 1662-9
32. - nster-Wandowski., A, Höltje, M. (2013) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 364, 159-77
33. Rummel, A. (2013) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 364, 61-90
34. Shapiro, R.E., Specht, C.D., Collins, B.E., Woods, A.S., Cotter, R.J. y Schnaar, R.L. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 30380-6
35. Chen, C., Fu, Z., Kim, J.J., Barbieri, J.T. y Baldwin, M.R. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 26569-77
36. Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C. y Schiavo, G. (2000) *J. Neurochem.*, 74, 1941-50
37. Deinhardt, K. y Schiavo, G. (2005) *Biochem. Soc. Symp.*, 72, 139-50
38. Deinhardt, K., Salinas, K., Verastigui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C. y Schiavo, G. (2006) *Neuron*, 52, 293-05
39. Gil, C., Chaib-Oukadour, I., Pelliccioni, P. y Aguilera, J. (2000). *FEBS Lett.*, 481, 177-82
40. Gil, C., Chaïb-Oukadour, I. y Aguilera, J. (2003) *Biochem. J.*, 373, 613-20
41. Jacky, B.P., Garay, P.E., Dupuy, J., Nelson, J.B., Cai, B., Molina, Y., Wang, J., Steward, L.E., Broide, R.S., Francis, J., Aoki, K.R., Stevens, R.C. y Fernández-Salas, E. (2013) *PLoS Pathog.*, 9(5):e1003369
42. Evinger, C. y Erichsen, J.T. (1986) *Brain Res.*, 380, 383-8
43. Manning, K.A., Erichsen, J.T. y Evinger, C. (1990) *Neuroscience*, 34, 251-63
44. Fishman, P.S. y Carrigan, D.R. (1987) *Brain Res.*, 406, 275-79
45. Coen, L., Osta, R., Maury, M. y Brûlet, P. (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94, 9400-9405
46. Larsen, K.E., Benn, S.C., Ay, I., Chian, R.J., Celia, S.A., Remington, M.P., Bejarano, M., Liu, M., Ross, J., Carmillo, P., et al. (2006) *Brain Res.*, 1120, 1-12

- e, G., Palacio, J., Miana-Mena, F.J., Muñoz, M.J., Zaragoza, P., Brûlet, P. y Osta, R. (2008) *Neurosci.*, 26, 459-65
48. Moreno-Igoa, M., Calvo, A.C., Ciriza, J., Muñoz, M.J., Zaragoza, P. y Osta, R. (2012) *Restor. Neurol. Neurosci.*, 30, 69-80
 49. Calvo, A.C., Moreno-Igoa, M., Mancuso, R., Manzano, R., Oliván, S., Muñoz, M.J., Penas, mC., Zaragoza, P., Navarro, X. y Osta, R. (2011) *Orphanet J. Rare Dis.*, 6, 10
 50. Bordet, T., Castelnau-Ptakhine, L., Fauchereau, F., Friocourt, G., Kahn, A. y Haase, G. (2001) *Cell Neurosci.*, 17, 842-54
 51. Carlton, E., Teng, Q., Federici, T., Yang, J., Riley, J. y Boullis, N.M. (2008) *Neurosurgery*, 63, 1175-84
 52. Figueiredo, D.M., Hallewell, R.A., Chen, L.L., Fairweather, N.F., Dougan, G., Savitt, J.M., Parks, D.A. y Fishman, P.S. (1997) *Exp. Neurol.*, 145, 546-54
 53. Schecterson, L.C. y Bothwell, M. (2009) *Dev. Neurobiol.*, 70, 332-8
 54. Skaper, S.D. (2012) *Methods Mol. Biol.*, 846, 1-12
 55. Chao, M.V. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.*, 4, 299-309
 56. Teng, K.K. y Hempstead B.L. (2004) *Cell Mol. Life*, 61, 35-48
 57. Schweigreiter, R. (2006) *Bioessays*, 28, 583-94
 58. Wang, K.C., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Segal, R. Y He, Z. (2002) *Nature*, 420, 74-8
 59. Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., Crowell, T., Cate, R.L., McCoy, J.M. y Pepinsky, R.B. (2004) *Nat. Neurosci.*, 7, 221-8
 60. Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., Hempstead, B.L. y Petersen, C.M. (2004) *Nature*, 427, 843-8
 61. Aguilera, J. y Yavin, E. (1990) *J. Neurochem.*, 54, 339-42
 62. Gil, C., Pelliccioni, P., Itarte, E. y Aguilera, J. (1999) *Neurochem. Int.*, 35, 281-91
 63. Pelliccioni, P., Gil, C., Najib, A., Sarri, E., Picatoste, F. y Aguilera, J. (2001) *J. Mol. Neurosc.*, 17, 303-10
 64. Gil, C., Chaïb-Oukadour, I., Blasi, J. y Aguilera, J. (2001) *Biochemical J.*, 356, 97-103
 65. Najib, A., Pelliccioni, P., Gil, C. y Aguilera, J. (2000) *FEBS Lett.*, 486, 136-42
 66. Gil, C., Pelliccioni, P., Itarte, E. y Aguilera, J. (1999) *Neurochem. Int.*, 35, 281-91
 67. Farrar, J.J., Yen, L.M., Cook, T., Fairweather, N., Binh, N., Parry, J. y Parry, C.M. (2000) *Tetanus. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 69, 292-301
 68. Galazka, A. y Gasse, F. (1995) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 195, 31-53
 69. Middlebrook, J.L. y Brown, J.E. (1995) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 195, 89-122
 70. Tregoning, J.S. Clare, S., Bowe, F., Edwards, L., Fairweather, N., Qazi, O., Nixon, P.J., Maliga, P., Dougan G. y Hussell, T. (2005) *Eur. J. Immunol.*, 35, 1320-6

71. Tierney, R., Nakai, T., Parkins, C.J., Caposio, P., Fairweather, N.F., Sesardic, D. y Jarvis, M.A. (2012) *Vaccine*, 30, 3047-52
72. Inserte, J., Najib, A., Pelliccioni, P., Gil, C. y Aguilera, J. (1999) *Biochem. Pharmacol.*, 57, 111-20
73. Najib, A., Pelliccioni, P., Gil, C. y Aguilera, J. (1999) *J. Neurochem.*, 72, 1991-8
74. Aguilera, J., López, L.A. y Yavin, E. (1990) *FEBS Lett.*, 263, 61-5
75. Bilgake, H., Weller, I., Bizzicini, B. y Habermann, E. (1981) *Nanyn-Schimiedeberg's Arch.Pharmacol.*, 316, 244-51
76. Habermann, E.H., Bigalke, H. y Heller, I. (1981) *Arch. Pharmacol.* 316, 135-42
77. Aguilera, J., López, L.A. y González-Sastre, F. (1991) *J. Neurochem.*, 56, 733-8
78. Gil, C., Najib, A. y Aguilera, J. (2003) *Neurochem. Int.*, 42, 535-42
79. Steiner, J.A., Carneiro, A.M. y Blakely, R.D. (2008). *Traffic*. 9,1393-402
80. Bilsland, L.G., Sahai, E., Kelly, G., Golding, M., Greensmith, L. y Schiavo, G. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 20523-8
81. Netzahualcoyotzi, C., Díaz, A., Mendieta, L., Martínez, I., Guevar, J., Herrando, M., Aguilera, J. y Limón, I. (2010) 40th Annual Meeting Neuroscience, San Diego, USA
82. Patricio, A., Díaz, A., Guevara, J., Aguilera, J. y Limón, I.D. (2013) 43rd Annual Meeting Neuroscience. San Diego, USA
83. Aguilera, J, Candalija, A, Miñano, A., Rodríguez-Alvarez, J. y Saura C.A. (2014) En preparación.
84. Aguilera, J. (2007) Patente: PCT/ES2007 Empresa: Universitat Autònoma de Barcelona
85. Osta, R., Moreno-Igoa, M., Calvo, A.C., Muñoz, M.J., Zaragoza, M.P. y Aguilera, J. (2010) Entidad titular: Empresas: Universidad de Zaragoza y Universitat Autònoma de Barcelona, Patente 12/754,552 (05/04/2010)
86. Chaïb-Oukadour, I., Gil, C. y Aguilera, J. (2004) *J. Neurochem.*, 90, 1227-36
87. Chaïb-Oukadour, I., Gil, C., Rodríguez-Alvarez, J., Ortega, A. y Aguilera, J. (2009) *Mol. Cel. Neurosc.*, 41, 297-303
88. Cassarino, D.S, Parks, J.K., Parker, W.D. Jr. y Bennett, J.P. Jr. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1453, 49-62
89. Hartmann, A., Hunot, S., Michel, P.P., Muriel, M.P., Vyas, S., Faucheux, B.A., Mouatt-Prigent, A., Turmel, H., Srinivasan, A., Ruberg, M., Evan, G.I., Agid, Y. y Hirsch, E.C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 2875-80
90. Mendieta, L., Venegas, B., Moreno, N., Patricio, A., Martínez, I., Aguilera, J. y Limón, I.D. (2010) *Neurosc. Res.*, 65: 98-106
91. Mendieta, L., Bautista, E., Sánchez, A., Guevara, J., Herrando-Grabulosa, M., Moran, J., Martínez, R., Aguilera, J. y Limó, I.D. (2012) *Neurosc. Res.* 74, 156-67
92. Cleveland DW, Rothstein JD. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 806-819
93. DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., et al. (2011) *Neuron*, 72, 245-56
94. Renton, A.E., Majounie, E., Waite, et al. (2011) *Neuron*, 72(2), 257-68
95. Gordon, P.H. y Meininger, V. (2011) *Nat. Rev. Neurol.*, 7, 650-4

96. Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A.J., Sendtner, M. y Shaw, P.J. (2011) *Nat. Rev. Neurol.*, 7, 616-30
97. Herrando-Grabulosa, M., Casas, C. y Aguilera, J. (2013) *J. Neurochem.*, 124, 36-44
98. Moreno-Igoa, M., Calvo, A.C., Penas, C., Manzano, R., Oliván, S., Muñoz, M.J., Mancuso, R., Zaragoza, P., Aguilera, J., Navarro, X. y Osta Pinzolas, R. (2010) *J. Mol. Med.*, 88, 297-308
99. Radenovic, L., Selakovic, V., Olivan, S., Calvo, A.C., Rando, A., Janac, B. y Osta, R. (2013) *Brain Res Bull.*, pii: S0361-9230(13)00187-1.
100. Fishmann, P., Matthews C.C., Parks, D.A., Box, M. y Fairweather N.F. (2006) *J. Neurosc. Res.*, 83, 1540-3

Semblanza del Dr. José Aguilera Ávila



Es licenciado en Ciencias (Sección Biológicas) y Doctor en Ciencias por la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB 1984). Su tesis doctoral versó sobre “el metabolismo serotoninérgico en la enfermedad tetánica” dirigida por el Profesor Francesc González-Sastre. A partir de la tesis se ha especializado en el estudio de las neurotoxinas clostridiales y sus capacidades farmacológicas.

Es Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y de Biología Molecular (desde 1992)

habiendo obtenido doce Tramos evaluables de Investigación, Gestión y Docencia de catorce posibles.

Es Investigador del *Institut de Neurociències* de la UAB (desde 2003). Ha sido Jefe de la Unidad de Bioquímica de la Facultad de Medicina (1997-2002), Director del Departamento de Bioquímica y de Biología Molecular de la UAB (2002-2008), y es el actual Director del *Institut de Neurociències* de la UAB desde 2009.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 45-64, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014).
(<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

MODELADO CINÉTICO DE VÍAS METABÓLICAS COMO ESTRATEGIA PARA ENTENDER SUS MECANISMOS DE CONTROL

KINETIC MODEL OF METABOLIC PATHWAYS TO UNDERSTAND THEIR MECHANISM OF CONTROL

Emma Saavedra* y Álvaro Marín-Hernández

Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Juan Badiano # 1. Col. Sección XVI, Tlalpan, CP 14080. México D.F., México

*Autor correspondiente. email: emma_saavedra2002@yahoo.com.

Tel 5573-2911x1298

Resumen

Cuando las enzimas trabajan en conjunto en una vía metabólica emergen propiedades sistémicas que no pueden deducirse a partir del análisis de sus propiedades individuales. El modelado cinético, como una estrategia “bottom-up” de la Biología de Sistemas, consiste en la construcción de modelos computacionales de las vías metabólicas a partir de las propiedades cinéticas de cada una de sus enzimas y transportadores. Un modelo cinético validado que

pueda predecir de manera correcta las concentraciones de intermediarios y flujos metabólicos en una célula sirve como un laboratorio virtual para estudiar el comportamiento de la vía en una amplia variedad de condiciones metabólicas. Así mismo, el modelado cinético junto con la aplicación de los fundamentos del Análisis del Control Metabólico nos ayuda a entender los mecanismos de control de la vía.

Palabras clave: modelado metabólico, modelo cinético, Biología de sistemas; bottom-up Biología de Sistemas; análisis del control metabólico.

Abstract

When metabolic enzymes work together in a metabolic pathway systemic properties emerge which cannot be elucidated from the analysis of their individual properties. Kinetic modeling, as a bottom-up Systems Biology approach, allows building computational models of complex metabolic pathways starting from the kinetic properties of its individual components. A validated kinetic model that can predict the intermediary concentrations and fluxes attained in a cell can serve as a virtual laboratory to study the pathway behavior under a wide variety of metabolic conditions. Moreover, kinetic modeling that also applies the fundamentals of Metabolic Control Analysis helps to our understanding of the underlying mechanisms that control the metabolic pathways.

Keywords: Metabolic modeling, kinetic model, Systems Biology, bottom-up Systems Biology, Metabolic Control Analysis

Introducción

Las células están siempre expuestas a cambios en su medio ambiente o en su ciclo celular y deben adaptarse a dichas perturbaciones a través de cambios concertados a todos los niveles de complejidad. Partiendo desde la regulación génica, transcripcional y postranscripcional y a través de interacciones de señalización, se inducen cambios que llevan a un nuevo estado que permita

responder a las demandas metabólicas y fisiológicas requeridas. A su vez, los cambios en el metabolismo pueden regular procesos a nivel genético, en circuitos de retroalimentación genético-metabólico [1].

El metabolismo intermediario está altamente regulado y controlado en cualquier tipo de célula. Aunque en los textos de Bioquímica los conceptos de regulación y control se utilizan indistintamente, en el campo del análisis del control del metabolismo se ha establecido una clara diferencia conceptual. La regulación metabólica se establece cuando una célula, tejido u organismo mantiene sus flujos metabólicos constantes a lo largo del tiempo a pesar de las fluctuaciones en las condiciones externas. La regulación está estrechamente relacionada a la homeostasis, en el que están involucrados diferentes mecanismos para mantener relativamente constante un estado interno; por ejemplo la glucosa en sangre se regula por la acción de la insulina y el glucagón sobre el metabolismo de los carbohidratos en diferentes tejidos. El término regulación también se aplica en la modulación de la actividad de una enzima o transportador. Por otro lado, el control se refiere al grado de influencia que tiene cada componente de una vía metabólica para ajustar los flujos o las concentraciones de sus intermediarios; dicho valor se puede determinar de manera cuantitativa [2]. La falta de regulación y control del metabolismo en células humanas puede dar origen o favorecer procesos patológicos como el cáncer, la diabetes o enfermedades de tipo metabólico las cuales, hasta ahora se reconoce, deben analizarse como redes de interacción metabólicas en lugar del efecto de moléculas aisladas [3-5]. Por lo tanto la reconstrucción y análisis funcional de todo el metabolismo de una célula requiere del uso de herramientas y estrategias computacionales para conseguir un análisis integral que considere todas las variables y parámetros involucrados que produzca respuestas cercanas a la fisiología celular.

Modelado metabólico

La generación de modelos computacionales de procesos celulares complejos es una de las metas de la Biología de Sistemas (BS; Systems Biology en inglés) [6]. La BS aplicada en particular al metabolismo reúne datos cuantitativos experimentales de vías metabólicas en modelos computacionales que puedan representarlas de manera virtual [7-9]. La meta a largo plazo de la BS metabólica es generar modelos computacionales que incluyan las vías metabólicas de toda la célula para construir su réplica virtual o “silicon cell” [10] y

posteriormente llegar hasta los siguientes niveles de organización celular como tejidos, órganos y organismos multicelulares.

La BS puede clasificarse dependiendo si el análisis experimental se realiza de lo general a lo particular (top-bottom systems biology) o de lo particular a lo general (bottom-up systems biology) [11]. En el primero, se analizan patrones de comportamiento en el todo (p.ej. en la célula) y se tratan de encontrar leyes empíricas que puedan explicar relaciones causa-efecto. Este enfoque se alimenta principalmente de datos provenientes del genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma o fluxoma [8]. En el segundo, el enfoque bottom-up o modelado cinético, la reacción de cada enzima/transportador de una red metabólica está representada por una ecuación que incluye sus propiedades cinéticas; por lo tanto, esta estrategia utiliza principalmente series de datos bioquímicos obtenidos de reacciones aisladas generados a lo largo de décadas de investigación metabólica y enzimática. Este enfoque, aparte de proveer información acerca de la organización de las vías metabólicas, permite entender y explicar cómo nuevas propiedades de las enzimas/transportadores emergen cuando interaccionan en conjunto en la vía metabólica, propiedades que no pueden deducirse a partir del análisis de sus propiedades cinéticas individuales [7, 12]. Esta estrategia de la BS ayuda a identificar los mecanismos de control (y regulación si se aplica el análisis de regulación; ver [12] para este tipo de análisis) del metabolismo. En este breve capítulo se revisará el modelado cinético de vías metabólicas como una estrategia o herramienta para entender sus mecanismos de control.

Conceptos básicos del metabolismo y su control

Para aproximarse al estudio del control del metabolismo y al modelado cinético de las vías metabólicas es necesario primero establecer algunos conceptos básicos y el marco teórico del Análisis del Control Metabólico. Para ampliar estos temas consultar [2; 13]:

1) *Estado metabólico*. En la célula, un estado metabólico particular está caracterizado por la concentración de metabolitos y flujos metabólicos en estado estacionario los cuales están determinados por reacciones bioquímicas. En el caso de las vías metabólicas, dichas reacciones están catalizadas por enzimas y transportadores.

2) *Flujo metabólico en estado estacionario*. El flujo final de una vía metabólica J (i.e. la velocidad de producción del metabolito final), está determinado por la

velocidad a la que catalizan en conjunto todas las enzimas/transportadores de la vía. En una vía metabólica lineal y sin cambios en la estequiometría de las reacciones, en el estado estacionario metabólico la velocidad parcial de catálisis (v_i) de todas las enzimas/transportadores de la vía es la misma. Por lo tanto, el flujo final de una vía metabólica es una variable que sirve de indicador de la velocidad de todos los componentes individuales del sistema. Cabe mencionar, que aún en las vías altamente ramificadas como la glucólisis en células de rápida proliferación como las tumorales y las parasíticas, este último supuesto puede aplicarse debido a que solamente el 5-10% del flujo total del carbono se direcciona hacia sus ramificaciones que alimentan rutas anabólicas [14, 15].

3) *Velocidad de catálisis de las enzimas en una vía metabólica.* Existe una diferencia significativa entre la velocidad máxima (V_{max}) de una enzima (o transportador) y su velocidad de catálisis (o de transporte) en la vía metabólica v_i . La V_{max} es un parámetro de velocidad cuando la enzima/transportador cataliza a concentraciones saturantes de sus sustratos y en ausencia de productos o moduladores alostéricos; este parámetro es propio de cada enzima/transportador y relativamente fácil de determinar experimentalmente con una enzima purificada o en un extracto celular. Por otro lado, la v_i es la velocidad de la enzima cuando está trabajando en conjunto con las demás enzimas de la vía metabólica en estado estacionario y en presencia de las concentraciones fisiológicas de todos sus ligandos (sustratos, productos, inhibidores, activadores) y como se discutió anteriormente su valor aproximado es el del flujo total de la vía.

Debido a que en el estado estacionario todas las enzimas de una vía metabólica catalizan a la misma velocidad v_i , es contradictoria la idea generalizada de que la enzima que controla el flujo de una vía metabólica es “la más lenta” (el paso limitante, o “rate-limiting step” o “cuello de botella”) o la que está al principio de la vía o la que tiene muchos moduladores alostéricos tal como se escribe en los libros de texto de Bioquímica. Para eliminar estos criterios cualitativos en la descripción de quién controla las vías metabólicas, a inicios de la década de los 70s, Kacser y Burns en Edimburgo, Escocia [16] y Heinrich y Rapoport en Berlín, Alemania [17] desarrollaron de manera independiente los fundamentos del Análisis del Control Metabólico (MCA por sus siglas en inglés) el cual es un marco teórico y experimental para analizar de manera *cuantitativa* cómo se distribuye el control de las vías metabólicas y entender sus mecanismos de control (revisado en [2, 13] para un breve resumen consultar [18]); de esta manera, se inició el análisis teórico y experimental de las vías metabólicas como redes de interacción y no como componentes aislados de un rompecabezas complejo.

En el MCA, el grado de control que una enzima de una vía metabólica ejerce sobre el flujo de la misma está definido por el coeficiente de control de flujo C_{ai}^J , donde J corresponde al flujo de la vía que se está evaluando y ai es la actividad a de la enzima i . Para determinar el C_{ai}^J , se debe variar la actividad de la enzima en la célula (sin afectar la actividad de los demás componentes de la vía) y se mide en paralelo el flujo de la vía metabólica; de la gráfica flujo *versus* actividad, el C_{ai}^J corresponde a la pendiente de la recta tangente a la curva (derivada) en el punto de interés del 100% de actividad (Fig. 1). La suma de los C_{ai}^J positivos y negativos (para las reacciones que favorecen y desfavorecen el flujo de la vía, respectivamente) de todas las enzimas/transportadores/procesos de la vía metabólica es igual a 1 (Teorema de la sumatoria). Una enzima con un C_{ai}^J cercano a 1 significa que es el principal sitio de control del flujo de la vía mientras que un valor que se acerca a 0 indica que la enzima no controla de manera importante, ya que la variación de su actividad en un intervalo grande no afecta el flujo de la vía (Fig. 1). A la fecha, los estudios del MCA en diversas rutas metabólicas no han encontrado enzimas con $C_{ai}^J = 1$ sino que el control de las vías está repartido en diferentes grados entre todas sus enzimas/transportadores/procesos aunque generalmente con dos o tres reacciones con un control relevante de 0.5 (50%). Por lo tanto, el MCA ha descartado el concepto dogmático de la “etapa limitante” y el control del metabolismo lo ha puesto en un contexto más flexible y dinámico en el cual el control de una vía puede presentar algunas variaciones dependiendo de la condición metabólica o el tipo de célula que se está analizando.

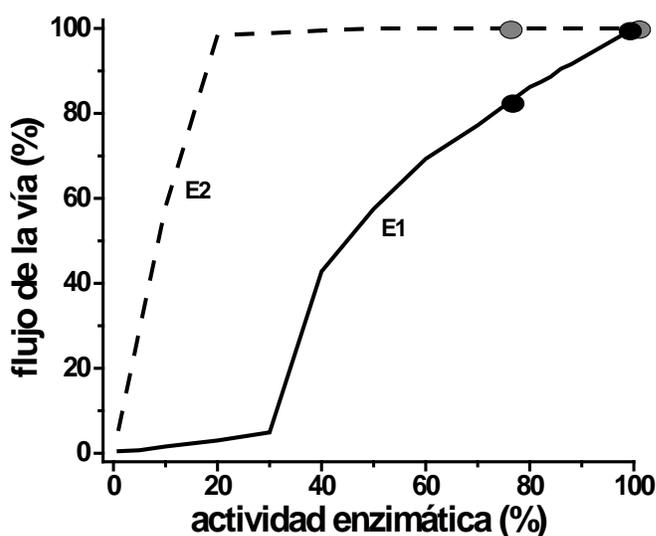


Fig. 1 Determinación experimental del C_{ai}^J .

En este gráfico normalizado, el C_{ai}^J se calcula a partir de la pendiente de los puntos experimentales cercanos al 100%, el cual corresponde al estado no perturbado. En el ejemplo, la enzima E1 tiene un C_{ai}^J cercano a 1 por lo que la variación de su actividad tiene efectos mayores en el flujo metabólico; la enzima E2 tiene un C_{ai}^J bajo, por lo que el flujo de la vía se afectará solamente cuando se inhiba su actividad más del 80%.

Que una enzima/transportador pueda controlar una vía metabólica en una célula depende de sus propiedades cinéticas, tales como su V_{max} en la célula, parámetro cinético que considera el contenido de enzima activa en la célula y su capacidad de catálisis ($V_{max}=k_{cat} \cdot [enzima_{total}]$), así como también a la modulación de su actividad a través de la afinidad por sus ligandos como sustratos y productos, o a través de regulación alostérica por activadores o inhibidores presentes a las concentraciones fisiológicas en la célula. Es por ello que el modelado cinético de vías metabólicas como una estrategia bottom-up de la BS, aparte de poder describir de manera matemática el comportamiento de la vía metabólica, cuando se aplican los fundamentos del MCA nos permite identificar los mecanismos que subyacen en el control de la vía y permite establecer porqué una enzima controla o no controla el flujo de la vía metabólica.

El proceso del modelado metabólico

Se puede decir que existen dos tipos de modelado de vías metabólicas: el modelado estructural y el modelado cinético [19-21].

En el modelado estructural (el cual se describe brevemente en esta revisión), el cual aplica el enfoque top-bottom de la BS, las reacciones bioquímicas se describen en términos únicamente estequiométricos, no contienen información cinética, y la vía se analiza de acuerdo a su organización (estructura). A partir de evaluar los cambios en las pozas de los metabolitos, el modelado estructural considera la estequiometría de las reacciones y aplica restricciones termodinámicas y balance de masas de los intermediarios para predecir los flujos metabólicos [19-21]. Este tipo de modelado metabólico tiene ciertas ventajas: (a) permite identificar las reacciones que están relacionadas por tener metabolitos en común, lo cual puede no ser obvio cuando se analizan las reacciones metabólicas por separado; (b) permite identificar la conservación de metabolitos: en las vías metabólicas existen grupos de metabolitos que están estrechamente relacionados y cuya conservación de masa es constante, por ejemplo ATP, ADP y AMP; NAD(P) y NAD(P)H, CoA y acetyl-CoA, GSH y GSSG; (c) permite identificar los módulos o grupos elementales de reacciones las cuales son el número mínimo de reacciones enzimáticas dentro de una vía metabólica que puede funcionar relativamente independiente del resto de la vía metabólica; (d) permite el uso de datos obtenidos por metabolómica y fluxómica. El Análisis del Balance de Flujos

(Flux Balance Analysis en Inglés) usa esta estrategia para reconstruir vías metabólicas en células y microorganismos completos [22]. La mayor ventaja de este tipo de modelado es que permite reconstruir todas las vías metabólicas de una célula para poder describir y predecir un fenotipo, sin embargo, la mayor desventaja es que no permite investigar y cuantificar el control del metabolismo ni determinar los mecanismos que subyacen en el control de las vías metabólicas [21].

Modelado cinético de vías metabólicas

El modelado cinético permite no solamente describir la estructura de las vías metabólicas, sino que también ayuda a entender sus mecanismos de control. Los modelos cinéticos integran y analizan al mismo tiempo todos los parámetros cinéticos de todas las enzimas y transportadores de una vía y las características particulares del estado metabólico celular. La construcción y validación de los modelos cinéticos se realizan con diferentes series de datos, para su construcción se utilizan los parámetros cinéticos de las enzimas/transportadores individuales determinados de manera experimental, mientras que la validación del modelo se realiza con los datos del análisis de la vía completa en la célula viva (concentración de intermediarios y flujos metabólicos en estados estacionario determinados en las células) [23]. Debido a la dificultad de contar con datos cinéticos para todas las reacciones que se llevan a cabo en la célula, hasta el momento, el modelado cinético solo se ha aplicado para pocas vías metabólicas completas y como entidades aisladas, principalmente la glucólisis. Sin embargo, se ha propuesto utilizar estos modelos cinéticos como módulos que pueden integrarse para formar redes metabólicas complejas [10].

Para la construcción del modelo, las propiedades cinéticas mínimas que se requieren determinar para cada enzima/transportador de la vía son las constantes de afinidad por ligandos (K_m sustratos, K_m productos) y las V_{max} determinadas en la célula, de preferencia en ambas direcciones de la reacción, o en el caso de reacciones irreversibles, conocer o determinar sus constantes de equilibrio (K_{eq}). En el caso de enzimas de las que se conozca que hay moduladores alostéricos (inhibidores o activadores), se necesitan los valores de las constantes de activación (K_a) e inhibición (K_i) y las concentraciones de estos metabolitos en caso de que no sean intermediarios de la vía metabólica. Además de esto, se requiere saber, generalmente a través de la literatura publicada o mediante experimentación *ad hoc*, el tipo de mecanismo cinético de cada

enzima/transportador, por ejemplo si sus cinéticas son de tipo hiperbólico o sigmoideal; si siguen mecanismos de equilibrio rápido y estado estacionario; para enzimas con más de un sustrato, si su unión es del tipo al azar, ordenado o ping-pong; el tipo de activación (esencial o no esencial) o de inhibición (competitiva, incompetitiva, mixta, etc) [24]. Lo más adecuado es incorporar en la ecuación de velocidad de cada reacción la mayor cantidad de información sobre las propiedades cinéticas de la enzima que la cataliza, obtenidas utilizando enzimas purificadas (p.ej. recombinantes) o en fracciones subcelulares enriquecidas con la enzima de interés [25, 26]. Es importante utilizar parámetros cinéticos determinados en condiciones fisicoquímicas lo más cercanas a las fisiológicas en cuanto al pH (el pH óptimo de una enzima puede estar alejado de lo fisiológico y el pH puede influir de manera muy negativa en la actividad), temperatura y composición iónica (i.e. alto K^+ /bajo Na^+ ; alto Mg^{2+} /bajo Ca^{2+}), así mismo que se hayan determinado en el mismo tipo celular y en las mismas condiciones experimentales. Al respecto, se han hecho esfuerzos para diseñar “amortiguadores fisiológicos” para obtener los parámetros cinéticos que incluyan iones y componentes orgánicos e inorgánicos a concentraciones que se encuentran en la célula [27]. Sin embargo, dada la complejidad de dichos amortiguadores, resultan de poca utilidad para realizar análisis cinéticos detallados tales como la determinación de las constantes de afinidad por los ligandos o mecanismos de reacción, debido a que algunas veces sus componentes interactúan con los sustratos de maneras inespecíficas.

Después de definir las ecuaciones de velocidad para cada reacción basadas en los mecanismos de reacción cinéticos, estas requieren traducirse de una manera que pueda interpretar un programa de cómputo adecuado. Se pueden utilizar programas matemáticos de uso general como Matlab (que requiere experiencia en programación) o programas especializados de modelado metabólico (para algunos programas consultar [28]). El simulador CoPaSi (por COMplex Pathway Simulator) [29] es una plataforma computacional disponible sin costo alguno, de uso amigable, con la ventaja de que realiza cálculos del MCA; esto es, calcula los C_{ai}^j de cada reacción de la vía así como otros coeficientes del MCA (coeficientes de control sobre la concentración de metabolitos y coeficientes de elasticidad de cada reacción enzimática (revisar [13 o 18] para la definición de estos coeficientes).

Independientemente del programa de cómputo que se utilice, el proceso que realiza es determinar la variación en la concentración de los metabolitos a lo largo del tiempo en función de las velocidades de las reacciones que lo producen y lo consumen; esto es, la concentración de cada metabolito estará determinada por

una ecuación diferencial ordinaria. En la Fig. 2 se muestra un ejemplo de dicho cálculo para el ATP utilizando el modelo cinético de la glucólisis del parásito *E. histolytica* [30]. Las reacciones que producen el ATP son la fosfoglicerato cinasa (PGK), piruvato fosfato dicinasa (PPDK) y acetil-CoA sintetasa (AcCoAS) mientras que aquellas que lo consumen son la hexocinasa (HK), la síntesis de glucógeno, y las demandas (reacciones de consumo) de ATP. Excepto para las últimas en que se utilizan constantes de acción de masas, las otras reacciones están definidas por una ecuación de velocidad con los parámetros de constantes de afinidad de cada ligando (K_a , K_b , K_i , K_p , K_q) y la V_{max} en las reacciones directa (V_{mf}) y reversa (V_{mr}) o la K_{eq} .

$$\frac{d([ATP] \cdot V_{\text{compartment}})}{dt} = -V_{\text{compartment}} \left[\frac{V_{mf(HK)} \cdot \frac{[Glucn] \cdot [ATP] \cdot [G6P] \cdot [ADP]}{K_{eq(HK)}}}{1 + \frac{[Glucn] \cdot [ATP]}{K_a(HK) \cdot K_b(HK)} + \frac{[Glucn] \cdot [ATP]}{\alpha \beta (HK) \cdot K_a(HK) \cdot K_b(HK)} + \frac{[AMP]}{K_i(HK)} + \frac{[Glucn] \cdot [AMP]}{\beta \gamma (HK) \cdot K_a(HK) \cdot K_b(HK)} + \frac{[AMP] \cdot [ATP]}{\gamma \delta (HK) \cdot K_i(HK) \cdot K_b(HK)} + \frac{[G6P] \cdot [ADP]}{K_p(HK)} + \frac{[ADP] \cdot [G6P] \cdot [ADP]}{\alpha \beta \gamma \delta (HK) \cdot K_p(HK) \cdot K_q(HK)}} \right] + V_{\text{compartment}} \left[\frac{V_f(PPDK) \cdot [PEP] \cdot [AMP] \cdot [PPi]}{\alpha \beta (PPDK) \cdot \beta \gamma (PPDK) \cdot K_a(PPDK) \cdot K_b(PPDK) \cdot K_c(PPDK)} + \frac{V_r(PPDK) \cdot [Pyv] \cdot [ATP] \cdot [Pi]}{\alpha \beta (PPDK) \cdot \beta \gamma (PPDK) \cdot K_p(PPDK) \cdot K_q(PPDK) \cdot K_r(PPDK)} \right] + V_{\text{compartment}} \left[\frac{V_f(AcCoAS) \cdot [acetyl-CoA] \cdot [Pi] \cdot [ADP]}{\alpha \beta (AcCoAS) \cdot \beta \gamma (AcCoAS) \cdot K_a(AcCoAS) \cdot K_b(AcCoAS) \cdot K_c(AcCoAS)} + \frac{V_r(AcCoAS) \cdot [CoA] \cdot [acetate] \cdot [ATP]}{\alpha \beta (AcCoAS) \cdot \beta \gamma (AcCoAS) \cdot K_p(AcCoAS) \cdot K_q(AcCoAS) \cdot K_r(AcCoAS)} \right] - V_{\text{compartment}} \cdot (k_1 \cdot [\text{glycogen synthesis}] \cdot [G6P] \cdot [ATP]) - V_{\text{compartment}} \cdot (k_1 \cdot [\text{ATP demand}] \cdot [ATP]) - V_{\text{compartment}} \cdot ((k_1 \cdot [ATP] \cdot [AMP] - k_2 \cdot [ADP] \cdot [ADP])) - V_{\text{compartment}} \cdot (k_1 \cdot [\text{PPi supply}] \cdot [ATP]) + V_{\text{compartment}} \left[\frac{V_{mf(PGK)} \cdot \frac{[BPG] \cdot [ADP]}{\alpha \beta (PGK) \cdot K_a(PGK) \cdot K_b(PGK)} - V_{mr(PGK)} \cdot \frac{[3PG] \cdot [ATP]}{\beta \gamma (PGK) \cdot K_p(PGK) \cdot K_q(PGK)}}{1 + \frac{[BPG] \cdot [ADP]}{K_a(PGK) \cdot K_b(PGK)} + \frac{[BPG] \cdot [ADP]}{\alpha \beta (PGK) \cdot K_a(PGK) \cdot K_b(PGK)} + \frac{[3PG] \cdot [ATP]}{\beta \gamma (PGK) \cdot K_p(PGK) \cdot K_q(PGK)} + \frac{[3PG] \cdot [ATP]}{K_p(PGK)} + \frac{[3PG] \cdot [ATP]}{K_q(PGK)}} \right]$$

Fig. 2 Ejemplo del cálculo de la concentración del intermediario ATP a lo largo del tiempo para la glucólisis de *E. histolytica* realizado por modelado cinético en el simulador CoPaSi.

Como la glucólisis, sin considerar sus ramificaciones, contiene 11 reacciones (desde el transportador de glucosa hasta la piruvato cinasa) y 18 metabolitos entre hexosas y triosas fosfato, adenín- y piridín-nucleótidos y Pi, y muchos metabolitos están conectados entre sí, el cálculo de la concentración de todos los intermediarios y flujo metabólico se tiene que hacer de manera simultánea, considerando los parámetros cinéticos de todas las reacciones involucradas hasta alcanzar el estado estacionario, al igual que una célula viva. La validez de un modelo surge de la precisión con la que pueda predecir las concentraciones de metabolitos y flujos determinados experimentalmente en las

mismas células y condiciones experimentales en las que se determinaron los parámetros cinéticos de las enzimas [23].

Una vez que se obtiene una primera versión del modelo, éste generalmente simula con bastante imprecisión las concentraciones de varios metabolitos o el flujo determinados experimentalmente y es en este punto donde la experiencia y el conocimiento bioquímico del investigador toman parte activa del proceso, identificando qué reacciones deben adicionarse al modelo o qué parámetros cinéticos requieren re-evaluación experimental. Esta etapa de la construcción del modelo consume bastante tiempo y requiere la búsqueda de antecedentes en la literatura que apoyen o descarten la inclusión de una nueva reacción enzimática o de un proceso metabólico además de su validación experimental en el modelo biológico de estudio. De esta manera, existe un proceso iterativo de modelado-experimentación hasta alcanzar un modelo refinado que pueda predecir lo más cercanamente posible el comportamiento de la vía (considerando que los modelos son una simplificación de la vía metabólica y que no van a predecir con absoluta exactitud lo que ocurre en la célula) con respecto a la concentración de intermediarios y flujos metabólicos observados en la célula.

Debido a la gran cantidad de datos cinéticos que se requieren para su construcción, en la literatura existen pocos modelos cinéticos en los que se hayan determinado todos los parámetros cinéticos en las mismas condiciones experimentales y en el mismo tipo celular. Algunos modelos cinéticos completos son aquellos construidos para la glucólisis de levadura, los parásitos *Trypanosoma brucei* y *Entamoeba histolytica* y en células tumorales [30-33] y para el metabolismo antioxidante en el parásito *Trypanosoma cruzi* [34]. Un gran porcentaje de los modelos cinéticos se han obtenido extrayendo los datos cinéticos de la literatura (para un listado completo de los modelos cinéticos consultar [9] o el sitio web JWS Online Cellular Systems Modeling (<http://jij.bio.vu.nl/>)).

Modelos cinéticos de vías metabólicas y sus mecanismos de control

La glucólisis es la vía metabólica que se ha modelado en una gran variedad de tipos celulares y en diferentes condiciones. Uno de los primeros modelos matemáticos para la glucólisis se construyó hace cuarenta años para los eritrocitos humanos por Rapoport y col. [35], el cual aplicó los fundamentos del MCA. En dicho modelo las enzimas que controlaron la vía fueron la HK (C_{ai}^J 0.69-0.73) y la fosfofructocinasa dependiente de ATP (ATP-PFK; C_{ai}^J 0.31-0.27); la piruvato

cinasa (PYK) no controló a pesar de ser otra enzima glucolítica típicamente alostérica. De manera sobresaliente, se ha encontrado a través de estudios del MCA más recientes que mientras la HK tiene un papel importante en el control del flujo glucolítico, el control de la ATP-PFK es poco la mayoría de las veces y se ha establecido que ésta última enzima tiene una función más relevante en la regulación de la glucólisis cuando las células cambian entre dos estados metabólicos muy diferentes para mantener la homeostasis. Por otro lado, un inconveniente del modelo pionero de Rapoport y col., es que no se consideraron los parámetros cinéticos del transporte de glucosa (GLUT), el cual se ha encontrado recientemente que es uno de los principales sitios de control del flujo glucolítico en *T. brucei*, levaduras y células tumorales [31-33] y en *E. histolytica* (Saavedra, manuscrito en preparación).

El parásito *E. histolytica* carece de las enzimas alostéricas ATP-PFK y PYK, las cuales consumen ATP y por ende catalizan reacciones irreversibles en el citosol de las células. En su lugar el parásito contiene enzimas que catalizan reacciones reversibles (ya que consumen PPI) y no son reguladas alostéricamente (fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato, PPI-PFK y piruvato fosfato dicinasa, PPDK). Entonces, *a priori* resultaba difícil predecir quién controlaba la vía. Con una versión actualizada del modelo cinético que previamente publicamos [30] construido con datos experimentales obtenidos en su mayoría con las enzimas recombinantes, se encontró que en este parásito las enzimas no alostéricas 3-fosfoglicerato mutasa y la alcohol deshidrogenasa bifuncional (esta última cataliza el último paso de la vía) compartían junto con el GLUT y la degradación de glucógeno, el control del flujo glucolítico hacia etanol (Tabla I). Las dos enzimas y transportador controlan debido a que sus valores de V_{max} en los parásitos son bajos con respecto a las demás enzimas de la vía, además la HK de amiba se inhibe por AMP en lugar de la glucosa-6-fosfato como la enzima de mamíferos; por otro lado, la degradación de glucógeno tiene control relevante debido a la baja afinidad del GLUT por glucosa externa. Utilizando otras dos estrategias del MCA que no implican modelado cinético tales como la titulación con inhibidores [36] y por análisis de elasticidades a partir de la determinación experimental de los coeficientes de elasticidad (Pineda y Saavedra, manuscrito en preparación) determinamos la distribución de control de la vía. De manera relevante, los valores de C_{ai}^{\sim} obtenidos fueron muy cercanos a los predichos por modelado cinético (Tabla I). Por lo tanto, un modelo extenso y validado, construido con parámetros cinéticos obtenidos experimentalmente en condiciones cercanas a las fisiológicas y en el mismo modelo biológico, es una estrategia eficiente para

identificar las enzimas controladoras de la vía metabólica, que son los sitios adecuados para intervención terapéutica.

Tabla I. C_{ai} determinados por modelado cinético y por otras estrategias del MCA para algunas reacciones de la glucólisis de *E. histolytica*.

Enzima	Modelado cinético	Titulación de la actividad	Análisis de elasticidades
Transporte de glucosa	0.34	~ 0.7	0.72
Degradación glucógeno	0.39		
PPi-PFK, triosafosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, 3-fosfoglicerato cinasa, 3-fosfoglicerato mutasa (PGAM), enolasa y PPDK	PGAM= 0.28		0.2
Alcohol deshidrogenasa bifuncional	0.21	0.33	0.18

Por otro lado, la glucólisis de células tumorales está aumentada en comparación con las células normales debido, en parte, al aumento en la expresión de todas las enzimas y transportadores de la vía; entonces se especuló que este incremento en las actividades pudiera tener impacto en la distribución de control. Con el objetivo de determinar las reacciones que controlan el flujo glucolítico en células tumorales, se construyeron los modelos cinéticos de las líneas tumorales AS-30D (hepatoma de rata) y HeLa (cáncer cérvico uterino humano) (Fig. 3) [33]. Se determinaron experimentalmente en condiciones cercanas a las fisiológicas los parámetros cinéticos de las enzimas presentes en la fracción citosólica y los flujos de las ramificaciones principales de la vía como la síntesis/degradación de glucógeno, la vía de las pentosas fosfato y la oxidación de piruvato por la mitocondria [33]. El modelo pudo predecir de manera muy acertada las concentraciones de intermediarios y flujos metabólicos. Además, el modelo logró predecir el comportamiento de la glucólisis en células HeLa expuestas a hipoxia e hipoglucemia, condiciones que se pueden desarrollar en un tumor sólido.

A través del modelado se determinó que en normoxia (21 % O₂) o hipoxia (0.1 % O₂) en células cultivadas en 25 mM glucosa, los principales sitios de control son la degradación de glucógeno ($C_{ai}^J = 0.33-0.57$), el GLUT ($C_{ai}^J = 0.32-0.39$) y la HK ($C_{ai}^J = 0.08-0.2$) [33, 37]. Cuando las células se expusieron a una baja concentración de glucosa (2.5 mM) el control del flujo se re-distribuyó principalmente entre el GLUT ($C_{ai}^J = 0.40$) y la HK ($C_{ai}^J = 0.24$) [38]. Esta diferencia en la distribución de control en células hipoglucémicas se debió a una menor contribución de la degradación de glucógeno ($C_{ai}^J = 0.19$), debido a la disminución de su contenido en la célula y a la expresión de isoformas de GLUT y HK de alta afinidad por glucosa. Esto se correlacionó con que las células expuestas a hipoglucemia fueron más sensibles a la citocalasina B, un inhibidor del GLUT [38].

El modelado cinético de la glucólisis tumoral nos permitió establecer que los principales sitios de control son los mismos sin importar la condición experimental, pero el grado de control que ejercen se modifica en respuesta a las variaciones en la disponibilidad de la glucosa externa u oxígeno, ya que estos factores pueden influir en el aumento de la expresión y el contenido de isoformas con diferentes propiedades cinéticas de los sitios que ejercen mayor control (GLUT y HK), lo que parece ser una manera eficaz para aumentar el flujo de la vía [33, 38].

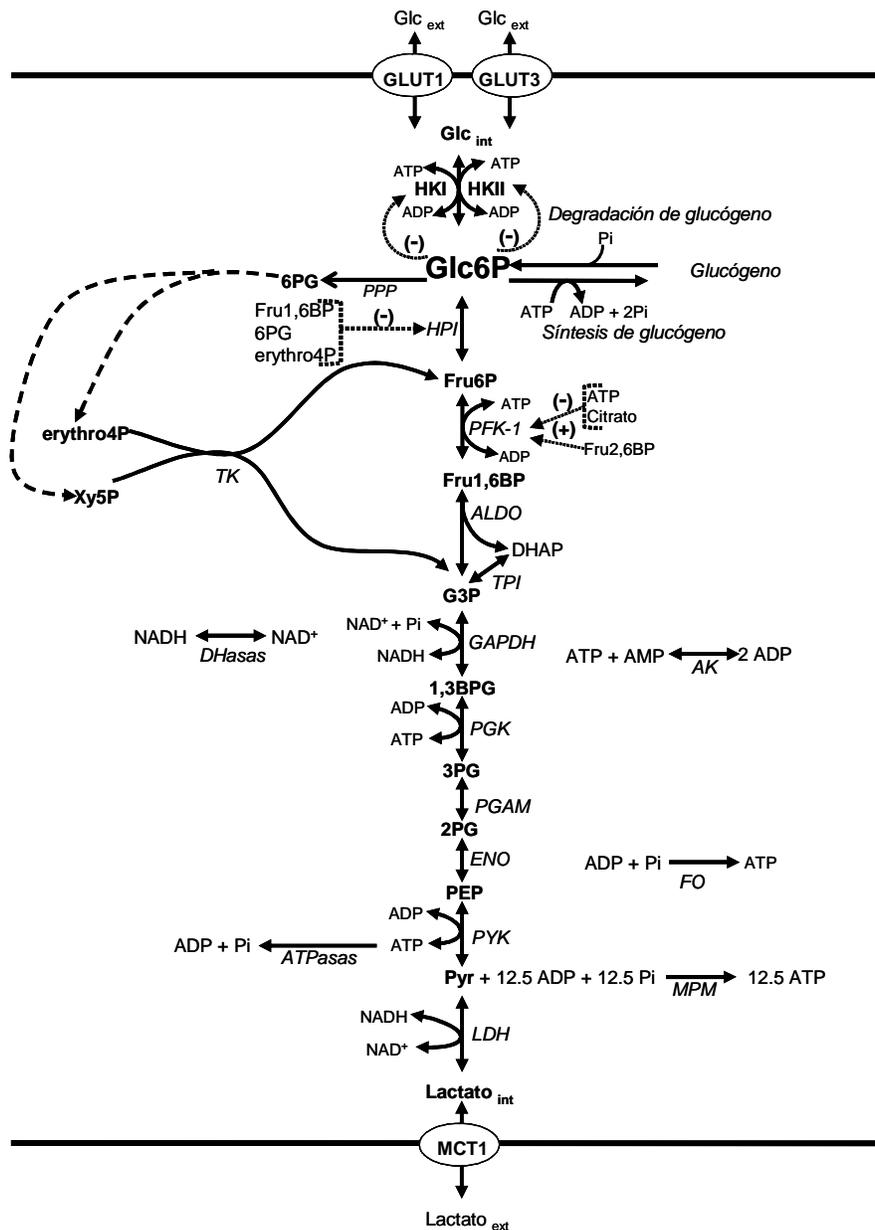


Figura 3. Reacciones incluidas en el modelo cinético de la glucólisis en células HeLa (modificado de [38]).

AK, adenilato cinasa; ALDO, aldolasa; ATPPasas, procesos consumidores de ATP; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; DHasas, reacciones consumidoras de NADH; ENO, enolasa; erythro4P, eritrosa-4-fosfato; Fru1,6BP, fructosa-1,6-bifosfato; Fru6P, fructosa-6-fosfato; Fru2,6BP, fructosa-2,6-bifosfato; FO, fosforilación oxidativa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; Glc, glucosa; Glc6P, glucosa-6-fosfato; GLUT1, transportador de glucosa 1; GLUT3, transportador de glucosa 3; HKI, hexocinasa I; HKII, hexocinasa II; HPI, hexosa fosfato isomerasa; LDH, lactato deshidrogenasa; MPM, consumo de piruvato por la mitocondria; MCT, transportador de

monocarboxilatos; PEP, fosfoenolpiruvato; PFK-1, fosfofructocinasa tipo 1; PGAM, 3-fosfoglicerato mutasa; PGK, 3-fosfoglicerato cinasa; PPP, vía de las pentosas fosfato; Pyr, piruvato; PYK, piruvato cinasa; Rib5P, ribosa 5-fosfato; TPI, triosa fosfato isomerasa; TK, transcetolasa; Xy5P, xilulosa 5-fosfato; 2PG, 2-fosfoglicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato; 6PG, 6-fosfogluconato, int, interno; ext, externo.

Otras rutas metabólicas como la síntesis de aminoácidos en bacterias, la vía de las pentosas en células de mamífero, la fotosíntesis y síntesis de carbohidratos de almacenamiento en plantas, entre otras, han sido modeladas cinéticamente (ver [9]). Nuestro grupo recientemente reportó la construcción del modelo cinético del metabolismo antioxidante en el parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas en América. En los tripanosomátidos el principal metabolito antioxidante es el tripanotión $[T(SH)_2]$, un conjugado de dos moléculas de glutatión (GSH) unidos por una molécula de espermidina [39]. Debido a que todo el sistema enzimático antioxidante de estos parásitos depende del $T(SH)_2$, en lugar del GSH como en humanos, este metabolismo se ha propuesto como un sitio de intervención terapéutica. En los tripanosomátidos *T. brucei* y *Leishmania* se ha demostrado por métodos genéticos de knock-out y knock-down que todas las enzimas son esenciales para el manejo del estrés oxidante, por lo que todas las enzimas se han propuesto como blancos para el diseño de fármacos contra estos parásitos. Nosotros aplicamos modelado cinético y MCA para determinar las enzimas que principalmente controlan la vía como una estrategia para jerarquizar e identificar los sitios terapéuticos racionalmente más adecuados desde el punto de vista metabólico [34]. Las enzimas que controlan la vía son la γ -glutamylcisteína sintetasa seguida de la tripanotión sintetasa. La enzima tripanotión reductasa (TryR) la cual ha sido y es todavía la enzima predilecta para diseño de fármacos, carece de control significativo tanto para la síntesis del tripanotión [34] como para la desintoxicación de peróxidos (González-Chávez y Saavedra, manuscrito en preparación). El poco o nulo control que ejerce la TryR se debe a su alta eficiencia catalítica y abundancia en la célula y saturación por sustratos, de tal manera que para afectar el flujo de estas vías interviniendo a esta enzima se requeriría > 99% inhibición. Quizá es por esta razón que la mayoría de los inhibidores diseñados para esta enzima y evaluados en la célula han sido poco exitosos (revisado en [39]).

Conclusiones

El propósito del modelado metabólico no es meramente replicar los datos experimentales, sino también darles un significado fisiológico para poder entender los mecanismos de control de las vías metabólicas. Es hasta este punto (*i.e.*, interpretación integral de los resultados) que se pueden apreciar las ventajas del modelado cinético. Una vez validado, se puede interrogar al modelo cinético para predecir o averiguar el comportamiento de la vía en un nuevo estado estacionario metabólico (el cual puede ser experimentalmente difícil de reproducir). Esto último generalmente requiere determinar menos parámetros experimentales que los requeridos para construir la primera versión del modelo. En esta etapa es en donde el modelo se convierte en un “laboratorio virtual”, cualquier componente puede alterarse o reemplazarse un número ilimitado de veces para determinar la robustez de la vía metabólica a cambios, por ejemplo, en la disponibilidad del sustrato inicial de la vía o puede incrementarse o inhibirse cada enzima/transportador para determinar la capacidad de respuesta de la vía metabólica. De esta manera, los experimentos *in silico* de “sobrexpresar” o “reprimir” la expresión de cualquier componente pueden realizarse y predecir de manera general el comportamiento de la vía metabólica para su posterior evaluación experimental. Además, a falta de inhibidores selectivos para cada enzima de una vía metabólica, la inhibición virtual puede facilitar el análisis.

A través del modelado cinético y el MCA se puede seleccionar de una manera más racional la(s) enzima(s) que requieren modificarse en la célula para modificar el flujo de la vía metabólica no solamente con fines terapéuticos, interviniendo farmacológicamente a las enzimas que tienen mayor control de la vía sino también con fines biotecnológicos, por ejemplo, para mejorar la producción de algún metabolito final o intermediario metabólico de interés económico [40]. Mediante estas estrategias se puede jerarquizar la manipulación experimental a una o dos reacciones de la vía, evitando de esta manera la estrategia muy arraigada y poco sistematizada de ensayo-y-error al manipular, una por una o al azar, a todos los componentes del sistema.

Agradecimientos

La investigación en los laboratorios de los autores está financiada por los donativos de CONACYT 178638 y 180322. Se agradecen los comentarios del Dr. Rafael Moreno-Sánchez a este manuscrito.

Referencias

1. Bevilacqua A, Wilkinson SJ, Dimelow R, Murabito E, Rehman S, Nardelli M, van Eunen K, Rossell S, Bruggeman FJ, Blüthgen N, De Vos D, Bouwman J, Bakker BM, Westerhoff HV (2008) *SEB Exp Biol Ser* **61**, 65-91.
2. Fell D (1997) *Understanding the control of metabolism*. Portland Press, London.
3. Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff HV, Lankelma J (2006) *Biosystems* **83**(2-3), 81-90.
4. Thiele I, Swainston N, Fleming RM, et al (2013) *Nat Biotechnol* **31**(5), 419-425
5. Mardinoglu A, Gatto F, Nielsen J (2013) *Biotechnol J* **8**(9), 985-96.
6. Westerhoff HV, Palsson BO (2004) *Nat Biotechnol* **22**(10), 1249-52.
7. Westerhoff HV, Kolodkin A, Conradie R, Wilkinson SJ, Bruggeman FJ, Krab K, van Schuppen JH, Hardin H, Bakker BM, Moné MJ, Rybakova KN, Eijken M, van Leeuwen HJ, Snoep JL (2009) *J Math Biol* **58**(1-2), 7-34.
8. Palsson B (2009) *FEBS Lett* **583**(24), 3900-4.
9. Hübner K, Sahle S, Kummer U (2011) *FEBS J* **278**(16), 2767-2857.
10. Snoep JL, Bruggeman F, Olivier BG, Westerhoff HV (2006) *Biosystems* **83**(2-3), 207-216.
11. Westerhoff HV (2011) *Methods Enzymol* **500**, 3-11.
12. Westerhoff HV, Verma M, Nardelli M, Adamczyk M, van Eunen K, Simeonidis E, Bakker BM (2010) *Biochem Soc Trans* **38**(5), 1189-96.
13. Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S, Olín-Sandoval V (2008) *J Biomed Biotechnol* **2008**, art 597913.
14. Cascante M, Marin S (2008) *Essays Biochem* **45**, 67-81.
15. Haanstra JR, van Tuijl A, van Dam J, van Winden W, Tielens AG, van Hellemond JJ, Bakker BM (2012) *Int J Parasitol* **42**(7), 667-673.
16. Kacser H, Burns JA (1973) *Symp Soc Exp Biol* **27**, 65-104. Reimpreso en *Biochem Soc Trans*. 1995; **23**(2), 341-66.
17. Heinrich R, Rapoport TA (1974) *Eur J Biochem* **42**(1), 89-95.
18. Nelson DL, Cox MM (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5a ed. Capítulo 15.2
19. Poolman MG, Assmus HE, Fell DA (2004) *J Exp Bot* **55**(400), 1177-1186
20. Maarleveld TR, Khandelwal RA, Olivier BG, Teusink B, Bruggeman FJ (2013) *Biotechnol J* **8**(9):997-1008.
21. Sajitz-Hermstein M, Nikoloski Z (2013) *PLoS Comput Biol* **9**(12), e1003368.
22. Thiele I, Palsson BØ (2010) *Nat Protoc* **5**(1):93-121.
23. van Gend C, Conradie R, du Preez FB, Snoep JL (2007) *In Silico Biol* **7**(2 Suppl), S27-35.
24. Segel IH (1975) *Enzyme Kinetics*. 1a ed. Wiley, New York.
25. Adamczyk M, van Eunen K, Bakker BM, Westerhoff HV (2011) *Methods Enzymol* **500**, 233-57.
26. Tummler K, Lubitz T, Schelker M, Klipp E (2014) *FEBS J* **281**(2):549-571.
27. van Eunen K, Bouwman J, Daran-Lapujade P, Postmus J, Canelas AB, Mensonides FI, Orij R, Tuzun I, van den Brink J, Smits GJ, van Gulik WM, Brul

- S, Heijnen JJ, de Winde JH, de Mattos MJ, Kettner C, Nielsen J, Westerhoff HV, Bakker BM (2010) *FEBS J* **277**(3),749-60.
28. van Gend C, Snoep JL (2008) *Essays Biochem* **45**:223-236.
 29. Hoops S, Sahle S, Gauges R, Lee C, Pahle J, Simus N, Singhal M, Xu L, Mendes P, Kummer U (2006) *Bioinformatics* **22**(24), 3067-74.
 30. Saavedra E, Marín-Hernández A, Encalada R, Olivos A, Mendoza-Hernández G, Moreno-Sánchez R (2007) *FEBS J* **274**(18), 4922-4940.
 31. Bakker BM, Michels PA, Opperdoes FR, Westerhoff HV (1997) *J Biol Chem* **272**(6), 3207-3215.
 32. Teusink B, Passarge J, Reijenga CA, Esgalhado E, van der Weijden CC, Schepper M, Walsh MC, Bakker BM, van Dam K, Westerhoff HV, Snoep JL (2000) *Eur J Biochem* **267**(17), 5313-29.
 33. Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Encalada R, Moreno-Sánchez R, Saavedra E (2011) *Biochim Biophys Acta* **1807**(6), 755-767.
 34. Olin-Sandoval V, González-Chávez Z, Berzunza-Cruz M, Martínez I, Jasso-Chávez R, Becker I, Espinoza B, Moreno-Sánchez R, Saavedra E (2012) *FEBS J* **279**(10), 1811-1833.
 35. Rapoport TA, Heinrich R, Jacobasch G, Rapoport S (1974) *Eur J Biochem* **42**(1), 107-20.
 36. Pineda E, Encalada R, Olivos-García A, Néquiz M, Moreno-Sánchez R, Saavedra E (2013) *FEBS Lett* **587**(2), 178-184.
 37. Marín-Hernández A, López-Ramírez SY, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, Saavedra E (2014a) Systems biology approaches to cancer energy metabolism. In: Aon et al. eds. *Systems biology of metabolic and signaling networks. Energy, mass and information transfer*. Springer Verlag, Berlín. p. 213-242.
 38. Marín-Hernández A, López-Ramírez SY, Del Mazo-Monsalvo I, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, Saavedra E (2014b) *FEBS J* submitted.
 39. Olin-Sandoval V, Moreno-Sánchez R, Saavedra E (2010) *Curr Drug Targets* **11**(12):1614-30.
 40. Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S, Quezada H, Jasso-Chávez R, Moreno-Sánchez R (2011) Rational Design of Strategies Based on Metabolic Control Analysis for Successful Manipulation of Pathways and Cellular Processes. In *Comprehensive Biotechnology*. Vol 1, 511-524. Elsevier. Amsterdam

Semblanza de la Dra. Emma Saavedra



Estudió Biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM y fue distinguida con la medalla Alfonso Caso de dicha institución (1991). Estudió la Maestría y Doctorado en Investigación Biomédica Básica en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en aspectos relacionados a la glucólisis del parásito *Entamoeba*

histolytica, obteniendo el grado de Doctorado en 1997 con mención honorífica. Realizó una estancia posdoctoral en la Universidad de Tufts, en Boston, Massachusetts, Estados Unidos en aspectos de la interacción hospedero-*Trypanosoma cruzi*. Posteriormente obtuvo una beca del Gobierno de Bélgica para realizar una estancia posdoctoral en la Unidad de Medicina Tropical en la Universidad Católica de Lovaina, en Bruselas, Bélgica para estudiar aspectos del metabolismo intermediario en parásitos tripanosomátidos. En el 2001 se incorporó como Investigadora Titular del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Su trabajo de investigación aplica los fundamentos del Análisis de Control Metabólico y modelado cinético de vías metabólicas energéticas y antioxidantes de microorganismos para validar sitios de intervención terapéutica. El trabajo del modelado cinético del metabolismo del T(SH)₂ en *T. cruzi* recibió mención honorífica del Premio Flisser-PUIS 2013 de trabajo doctoral en parasitología. La Dra. Saavedra ha publicado 43 artículos en revistas indizadas de circulación internacional las cuales han recibido más de 1100 citas; además ha publicado 11 artículos en capítulos de libros internacionales y en revistas de circulación nacional. Ha titulado a 6 alumnos de licenciatura y 3 de posgrado. Actualmente es nivel II del Sistema Nacional de Investigadores.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 65-84, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

EL INYECTISOMA DE BACTERIAS PATÓGENAS: DOS HISTORIAS DE UN DISPOSITIVO MOLECULAR

THE INJECTISOME OF PATHOGEN BACTERIA: TWO STORIES OF A MOLECULAR DISPOSITIVE

José Eduardo Soto Guzmán y Bertha González Pedrajo

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-243, México, D.F. 04510 México. Teléfono: (5255) 5622-5965. Fax: (5255) 5622-5611

Dirección de correspondencia: Bertha González-Pedrajo, bpedrajo@ifc.unam.mx

Resumen

El sistema de secreción tipo III (SST3) o inyectisoma es un complejo multiproteico utilizado por bacterias Gram negativas para inyectar proteínas directamente al citoplasma de células eucariontes con el objeto de manipular procesos celulares en beneficio de la bacteria.

El estudio de los SST3 bacterianos ha sido de gran interés, ya que estos dispositivos moleculares son elementos clave tanto en la virulencia de bacterias patógenas, como en el establecimiento de relaciones simbióticas de muchas

bacterias con organismos eucariontes. De manera paralela, en años recientes, ha habido un interés creciente por explotar este sistema de secreción con fines biotecnológicos.

En la presente revisión se hace una reseña de la importancia que tienen los SST3 en la patogénesis microbiana, así como de las futuras aplicaciones que se vislumbran para esta nanomáquina en el campo de la medicina y la biotecnología.

Palabras clave: Inyectisoma, bacteria, secreción, patogénesis, nanomáquina.

Abstract

The type III secretion system (T3SS) or injectisome is a multi-protein complex used by Gram-negative bacteria to inject proteins directly into the cytoplasm of eukaryotic cells in order to manipulate normal cellular processes to the benefit of the bacterium.

The study of bacterial T3SS has been of great interest because these molecular devices are key elements underlying microbial pathogenesis and symbiotic relationships between bacteria and eukaryotic organisms. In addition, in recent years, there has been a growing interest to exploit this secretion system for biotechnological purposes.

In the present review, we discuss the importance of the T3SS for microbial pathogenesis as well as the potential future applications of this nano-machine in the medicine and biotechnology fields.

Keywords: Injectisome, bacteria, secretion, pathogenesis, nano-machine.

Introducción a los SST3

Cien años atrás, las infecciones bacterianas eran la principal causa de mortandad en países industrializados. Décadas después, en la era dorada de los antibióticos, se pensó que las infecciones bacterianas no eran más una amenaza a la salud pública por lo que los esfuerzos en investigación clínica se dirigieron a enfermedades no transmisibles. Sin embargo, según cifras de la Organización

Mundial de Salud, las enfermedades infecciosas actualmente son la segunda causa de muerte, sólo detrás de las enfermedades cardiovasculares [1].

En bacterias, la secreción de proteínas es particularmente importante para la manipulación y explotación de ciertos nichos ecológicos. Muchas bacterias Gram negativas utilizan el sistema de secreción tipo III (SST3) o inyectisoma para secretar proteínas que les permiten colonizar a hospederos eucariontes. Por esto el inyectisoma es un elemento crucial en las estrategias de patogenicidad y simbiosis de una gran variedad de bacterias.

El SST3 es una compleja nano-estructura multi-proteica que funciona como una jeringa molecular, la cual permite translocar proteínas desde el citoplasma bacteriano directamente al interior de células eucariontes hospederas. Las proteínas que se translocan, a las que se les denomina efectores, despliegan un amplio arsenal de actividades bioquímicas dentro del citoplasma de la célula eucarionte con el objeto de modular las funciones biológicas normales del hospedero en beneficio de la bacteria [2]. Entre las enfermedades causadas por patógenos bacterianos a través del inyectisoma se encuentran la peste bubónica (Cuadro I), fiebre tifoidea, disentería, infecciones hospitalarias secundarias como neumonía y enfermedades de transmisión sexual, entre otras [3] (Tabla I).

Los genes que codifican para los SST3 comúnmente se encuentran agrupados en el cromosoma bacteriano como islas genómicas (cuando las islas codifican para genes que contribuyen a la virulencia se les llama islas de patogenicidad). Excepciones representativas a esto las encontramos en el inyectisoma de *Yersinia* spp. el cual se encuentra codificado en el plásmido pYV o el SST3 de *Chlamydia*, cuyos genes codificantes se encuentran diseminados en al menos 6 diferentes loci cromosomales [4].

Las bacterias típicamente adquieren las islas de patogenicidad que codifican para el SST3 mediante transferencia horizontal [5]. Un reflejo de esto es el contenido anómalo de G+C de estos genes respecto al del promedio del genoma bacteriano hospedero, así como la inserción de las islas dentro de genes que codifican para tRNAs redundantes o no esenciales [6].

Los SST3 de virulencia y el sistema de secreción flagelar bacteriano se encuentran relacionados evolutivamente [5]. Estos dos organelos comparten alrededor de 8 a 10 proteínas cuya secuencia y/o estructura se encuentran conservadas [7,8]. Estas proteínas homólogas están localizadas en la membrana interna bacteriana o se encuentran asociadas a ésta y conforman el núcleo del aparato de exportación. Datos recientes obtenidos por genómica comparativa

sugieren que los SST3 de virulencia surgieron a partir de un sistema flagelar ancestral mediante un proceso de exaptación (reclutamiento de componentes del aparato flagelar para llevar a cabo una nueva función de secreción) [9].

Cuadro I. La peste negra o cómo influyó el SST3 en la historia de Europa

La peste negra ha sido una de las pandemias más devastadoras en la historia de la humanidad, causando la muerte de más de un tercio de la población de Europa entre los años 1348 y 1350. Aunque existen diferentes teorías acerca del agente etiológico de la peste negra, análisis de DNA antiguo de víctimas del norte y sur de Europa indican que el patógeno bacteriano *Yersinia pestis* fue el responsable de esta epidemia [10,11]. La plaga trajo como consecuencia profundos cambios sociales, económicos, artísticos y hasta religiosos [12].



El efecto de la peste negra sobre la vida europea medieval fue tal que influenció de manera importante el trabajo artístico de la época. La imagen aquí mostrada del cuadro con tono apocalíptico de Pieter Brueghel, “El triunfo de la muerte”, se interpreta como una visión alegórica a las epidemias de ese entonces.

La plaga se transmite por la picadura de pulgas procedentes de ratas. Una vez dentro del torrente sanguíneo, *Yersinia pestis* es capturada por los macrófagos ganglionares, prolifera en los ganglios linfáticos y estos se hinchan formando un bubo (esto ocurre especialmente en la ingle, de ahí el nombre de peste bubónica pues “*boubon*” quiere decir “ingle” en griego).

Aunque existen otros factores de virulencia que contribuyen a la capacidad invasiva de *Y. pestis*, el tropismo por el tejido linfático y la capacidad de resistir a

la respuesta inmune primaria del organismo infectado se da esencialmente gracias al SST3 [13,14] del cual se habla en el texto principal.

Tabla I. Rol ecológico de algunos SST3 bacterianos

Bacteria	Hospedero	Relación con el hospedero	Efecto de la interacción	Efectores participantes*
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	Humano	Patógeno	Diarrea acuosa y persistente, cólicos	Tir, Map, EspF/G/H/Z, NleA/B1/B2/C/D/H1/H2
<i>Shigella flexneri</i>	Humano	Patógeno	Disentería bacilar, diarrea, vómito	IpaA/B/C, IpgB1/2/D, VirA, OspF/G
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Humano, vaca, cerdo	Patógeno	Fiebre entérica, enterocolitis/diarrea, bacteremia	SPI-1 [®] : AvrA, SipA/C, SopA/B, SptP. SPI-2 [®] : SpiC, SopD/E, D2, E2, SifA
<i>Yersinia pestis</i>	Humano, vaca, roedores	Patógeno	Diarrea, enterocolitis, peste	YopE/H/J/M/T, YpkA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Humano	Patógeno oportunista	Neumonía, infecciones urinarias, infecciones post-operatorias en heridas y quemaduras	ExoS/T/U/Y
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Humano	Patógeno oportunista	Diarrea, otitis, endoftalmítis	VopA/C/E/F/L/T/V/X
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Humano	Patógeno intracelular obligado	Infecciones oculares, genitales y pulmonares	CPAF, Tarp, CT621, CT622, CT694
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peces	Patógeno	Furunculosis	Ati2, AexT, AopH/O/P
<i>Edwardsiella tarda</i>	Peces	Patógeno	Edwardsiellosis (septicemia, hemorragias, nefritis, hepatitis)	EseG/H/I/J/K/L
<i>Xanthomonas campestris</i>	Plantas (pimiento, tomate)	Patógeno	Mancha bacteriana	XopC/D/E1/E2/J, AvrBs2/3
<i>Erwinia amylovora</i>	Plantas (manzano, peral, membrillo)	Patógeno	Fuego bacteriano (necrosis)	DspA/E, HrpA/N/W
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Plantas (soya)	Simbionte	Necesario para la eficiente formación de nódulos fijadores de nitrógeno	NopL/M/P
<i>Sodalis glossinidius</i>	Insectos (mosca tse-tse)	Simbionte	Necesario para la exitosa invasión de las células hospederas de insecto	SG0576, SG0764

* Se incluye sólo un sub-conjunto representativo del total de los efectores secretados por las bacterias mencionadas.

& SPI-1: Isla de patogenicidad 1 de *Salmonella*; SPI-2: Isla de patogenicidad 2 de

Estructura y funcionamiento del SST3

La maquinaria del inyectisoma tiene una masa molecular aproximada de ~3.5 MDa y está conformada por alrededor de 20 proteínas distintas, muchas de ellas en estado oligomérico [15,16].

Por razones históricas, la nomenclatura que se utiliza para designar a las proteínas que conforman el inyectisoma en diferentes bacterias no se ha unificado (Tabla II). Sin embargo, para facilitar la comunicación, existe la propuesta de que los componentes de los nuevos sistemas de secreción identificados se nombren acorde con la nomenclatura existente para el inyectisoma de *Yersinia* [17].

Tabla II. Nomenclatura de los componentes del inyectisoma en distintas bacterias

	Función	<i>Yersinia</i>	EPEC	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Rhizobium</i>	Flagelo
Estructuras extracelulares	Tanslocón	YopB	EspD	SipB	IpaB	PopB	CopB2	HrpF	-	-
	Translocón	YopD	EspB	SipC	IpaC	PopD	-	-	-	-
	Punta de la aguja	LcrV	EspA	SipD	IpaD	PcrV	CT584	-	-	FliC*
	Aguja	YscF	EscF	PrgI	MxiH	PscF	CdsF	-	-	-
Cuerpo basal	Anillo de ME	YscC	EscC	InvG	MxiD	PscC	CdsC	HrpA1	RhcC1/RhcC2	-
	Anillo de MI	YscJ	EscJ	PrgK	MxiJ	PscJ	CdsJ	HrpB3	RhcJ	FliF
	Anillo de MI	YscD	EscD	PrgH	MxiG	PscD	CdsD	HrpD5	-	-
	Eje interno	YscI	EscI	PrgJ	MxiI	PscI	-	HrpB2	-	-
Aparato de exportación y componentes citosólicos	Aparato de exportación	YscR	EscR	SpaP	Spa24	PscR	CdsR	Orf2	RhcR	FliP
	Aparato de exportación	YscS	EscS	SpaQ	Spa9	PscS	CdsS	HrcS	RhcS	FliQ
	Aparato de exportación	YscT	EscT	SpaR	Spa29	PscT	CdsT	HrpB8	RhcT	FliR
	Aparato de exportación	YscU	EscU	SpaS	Spa40	PscU	CdsU	HrcC	RhcU	FliH
	Aparato de exportación	YscV	EscV	InvA	MxiA	PcrD	CdsV	HrpC2	RhcV	FliA
	Plataforma de clasificación (anillo C)	YscQ	EscQ	SpaO	Spa33	PscQ	CdsQ	HrcQ	RhcQ	FliM/FliN
	Plataforma de clasificación	YscK	EscK	OrgA	MxiK	PscK	CT560	HrpB4	-	FliG ¿?
	Tallo periférico (inhibidor de la ATPasa)	YscL	EscL	OrgB	MxiN	PscL	CdsL	HrpB5	RhcL	FliH
	ATPasa	YscN	EscN	InvC	Spa47	PscN	CdsN	HrpB6	RhcN	FliI
	Tallo central (activador de la ATPasa y chaperona escolta)	YscO	EscO	InvI	Spa13	PscO	CdsO	-	-	FliJ
Otro	Regla molecular	YscP	EscP	InvJ	Spa32	-	CT671	HpaC	-	FliK
	Regulador de la secreción	YopN	SepL	InvE	MxiC	-	CopN	-	-	-

ME: membrana externa, MI: membrana interna. Modificado de Chatterjee, 2013 [3], Abby, 2012 [9] y *Pallen [63]

En nuestro laboratorio utilizamos a la bacteria *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) como microorganismo modelo para el estudio del SST3. EPEC coloniza el epitelio intestinal humano, principalmente de niños menores de dos años de países en vías de desarrollo, produciendo una lesión histopatológica característica que da lugar a la enfermedad gastrointestinal [18]. En esta sección se usará el inyectisoma de EPEC como arquetipo para describir los componentes que conforman a los SST3 en general.

Morfológicamente es posible diferenciar tres estructuras que componen al SST3 (Fig. 1):

Estructuras extracelulares (aguja/translocón)

La aguja es un conducto extracelular elongado de una longitud, dependiendo de la especie bacteriana, de entre 45 y 80 nm; formado por la polimerización helicoidal de subunidades de la proteína EscF en el caso de EPEC, YscF en *Yersinia* o PrgI en el caso de *Salmonella*. En el interior de esta estructura existe un canal hueco de aproximadamente 2.5 nm de diámetro que permite el paso de los sustratos que serán secretados. Debido al diámetro interno de este conducto, es necesario que los sustratos viajen desplegados o parcialmente desplegados [19,20].

Una característica particular del inyectisoma de EPEC es la presencia de un filamento largo y flexible que se extiende desde la aguja (Fig. 1). Esta estructura tubular se forma por la polimerización de la proteína EspA, alcanzando una longitud de 75 a 260 nm, con un diámetro externo de 12 nm y un canal central con un diámetro de 2.5 nm [21]. Se piensa que esta peculiaridad del inyectisoma de EPEC se debe a que en el intestino esta bacteria se encuentra separada de su célula hospedera blanco -el enterocito- por una gruesa capa mucosa que recubre a estas células, por lo que la presencia del filamento EspA facilita el acceso a la membrana del enterocito [22].

El punto de contacto entre un inyectisoma y la célula hospedera está mediado por el translocón. Típicamente, el translocón es un complejo heterooligomérico constituido por una proteína hidrofílica (llamada punta, representada por EspA) que interacciona con la aguja, y dos proteínas hidrofóbicas (EspB y EspD) que forman un poro, el cual se inserta en la membrana plasmática de la célula eucarionte. De esta forma, el translocón forma un continuo con la aguja permitiendo así la translocación de sustratos [23].

Cuerpo basal

El cuerpo basal es una base cilíndrica, similar a la estructura basal del flagelo, compuesto por tres anillos embebidos en las membranas interna (MI) y externa (ME) (Fig. 1). En EPEC, el anillo embebido en la ME se encuentra formado por un estimado de 12 subunidades de la proteína EscC -la cual es un

miembro de la familia de las secretinas- [24,25]. En la MI se localizan dos anillos; uno formado por la lipoproteína periplásmica EscJ, la cual se piensa que se ancla a la MI como un anillo de 24 subunidades [26]. El otro anillo de MI se encuentra formado por la proteína EscD. Existe a su vez un eje interno periplásmico, formado por la proteína EscI, que une a los anillos de ambas membranas [27].

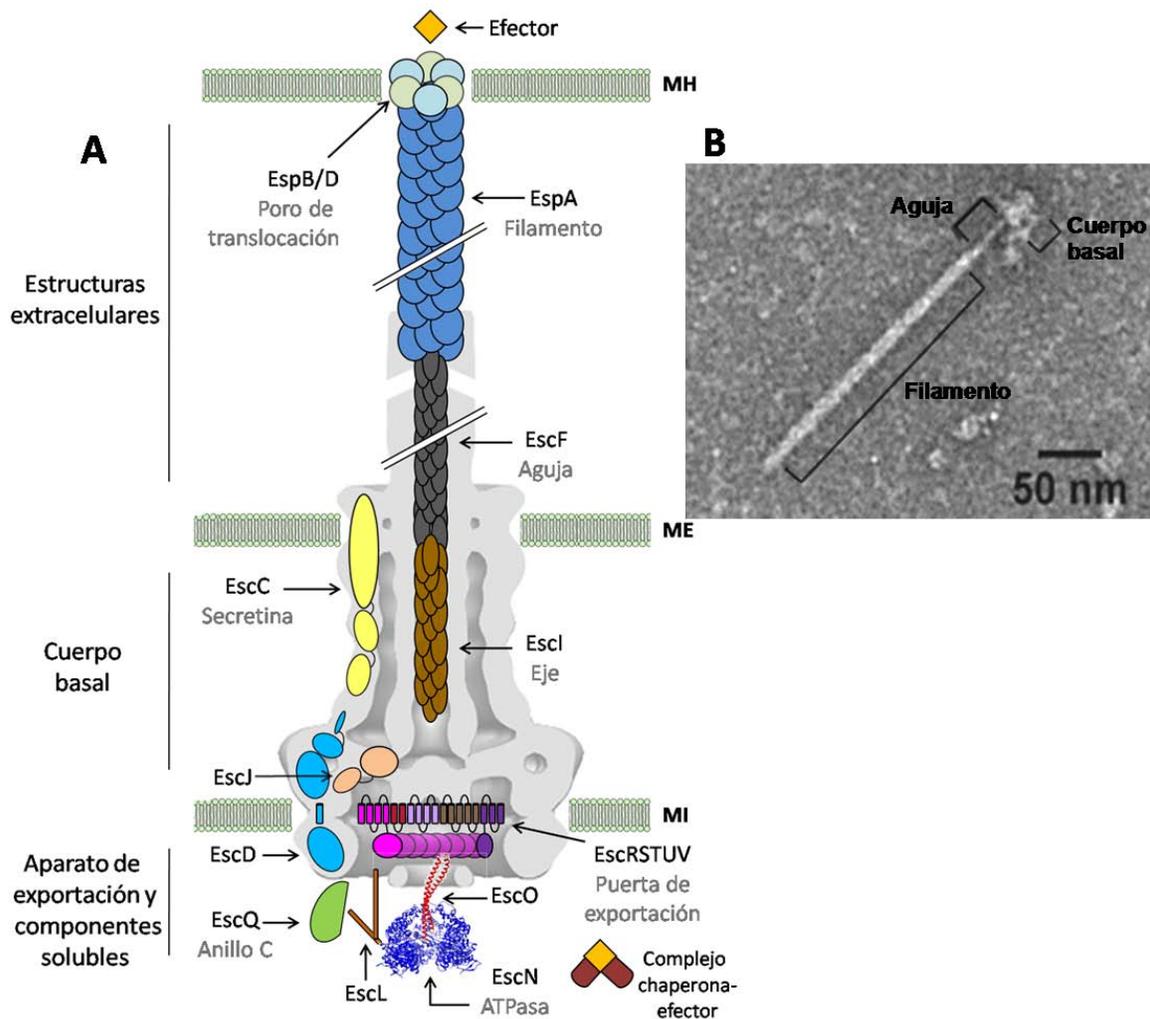


Figura 1. Estructura del SST3 de EPEC. (A) Esquema del inyectisoma de EPEC en donde se muestran las tres super-estructuras que lo componen. El esquema no se encuentra a escala y, por simplicidad, no se representan todos los cruces transmembrales para una mejor visualización de los componentes de la puerta de exportación. Membrana del hospedero eucariote (MH), membrana externa (ME) y membrana interna (MI). Modificado de Worrall, 2011 [28]. (B) Imagen de microscopía electrónica de transmisión de un inyectisoma purificado de EPEC. Tomado de Monjarás, 2012 [29].

Aparato de exportación y componentes solubles

En la base del SST3 se encuentra un conjunto de proteínas citoplásmicas y de proteínas intermembranales asociadas a la membrana interna, altamente conservadas entre los SST3 de diferentes patógenos bacterianos y que se conocen como el aparato de exportación. Se considera que el aparato de exportación es el encargado de reconocer los sustratos a secretarse [30], así como de hacer al SST3 competente para la secreción [31].

Este grupo de proteínas incluye a cinco componentes esenciales que forman la puerta de exportación (EscRSTUV) (Fig. 1). Se predice que la estructura de EscR, EscS y EscT se encuentra dominada por cruces transmembranales, mientras que EscU y EscV, además de las hélices transmembranales, tienen grandes dominios citoplásmicos [30].

Del lado citosólico del inyectisoma se encuentra la ATPasa EscN, componente esencial de los SST3. La ATPasa del inyectisoma está relacionada evolutivamente con la ATPasa flagelar (FliI) y con las subunidades α y β de la F₀F₁-ATP sintasa [9,32]. La ATPasa del SST3 de virulencia juega un rol crítico en el reconocimiento de los efectores que serán secretados.

La operación eficaz del inyectisoma requiere de la asistencia de una serie de proteínas pequeñas llamadas chaperonas las cuales se unen en el citoplasma a los sustratos específicos que serán secretados, estabilizándolos y manteniéndolos en una conformación parcialmente desplegada o competente para la secreción [33,34]. La ATPasa reconoce y disocia los complejos chaperona-sustrato de manera ATP dependiente para permitir el paso de estos últimos a través del complejo aguja [35].

La proteína EscL interacciona con la ATPasa EscN [36] y se ha mostrado que es un regulador negativo de la actividad de la ATPasa tal como su homólogo flagelar FliH [37]. Otro componente que interacciona con EscN y con EscL es la proteína EscO, que al igual que FliJ en el sistema flagelar, estimula la actividad catalítica de la ATPasa EscN (Romo M., datos no publicados). Las tres proteínas en conjunto forman lo que se conoce como el complejo ATPasa del SST3 de virulencia.

EscQ es otro componente citosólico esencial del inyectisoma de EPEC [36]. Aunque hace falta evidencia directa, se sugiere que EscQ forma una estructura anular en la base del inyectisoma equivalente al anillo C del flagelo (formado por las proteínas FliM y FliN). Adicionalmente, se ha visto por estudios genéticos que

su homólogo SpaO en el SST3 de *Salmonella* funge como una plataforma de clasificación para la secreción ordenada de sustratos [38].

Biogénesis del SST3 o como ensamblar una máquina de secreción molecular

El inyectisoma es una compleja máquina molecular que se autoensambla, lo cual requiere de una serie de pasos ordenados.

En *Yersinia enterocolitica* se ha estudiado recientemente la biogénesis del SST3 de virulencia [30,39,40], por lo que en este apartado se mencionarán los datos que se tienen a la fecha del ensamblaje de este inyectisoma. Sin embargo, existen reportes en inyectisomas de otros patógenos como EPEC [29,41] y *Salmonella* [31] en donde se encuentran paralelismos en el proceso de ensamblaje con el de *Yersinia* por lo que se piensa que la ruta de biosíntesis se encuentra conservada en los distintos SST3.

El ensamblaje inicial del inyectisoma comienza en las membranas bacterianas a través de dos ramas independientes (Fig. 2). Por un lado, la inserción en la membrana externa y oligomerización de la secretina YscC, sirve como punto de nucleación para el ensamblaje de los dos anillos de membrana interna constituidos por las proteínas YscD y YscJ. Por otro lado, en una ruta separada, los componentes de la puerta de exportación (YscRSTUV) se ensamblan en la membrana interna de manera autónoma. Cuando ambas plataformas convergen interaccionando el anillo de ME con el de MI, YscJ conecta a estas dos estructuras. En esta primera etapa, los componentes se exportan e insertan en la membrana mediante la vía general de secreción Sec.

Posteriormente se incorporan los componentes citoplásmicos (complejo ATPasa y anillo C) en la base del inyectisoma [39]. Cuando el complejo ATPasa se ha acoplado en la base de la puerta de exportación, la estructura basal del inyectisoma recién formada puede comenzar a secretar sustratos vía SST3. Entre las primeras proteínas que se secretan por esta vía se encuentran el eje (YscI) y la aguja (YscF), a las cuales se les denomina “sustratos tempranos” [42].

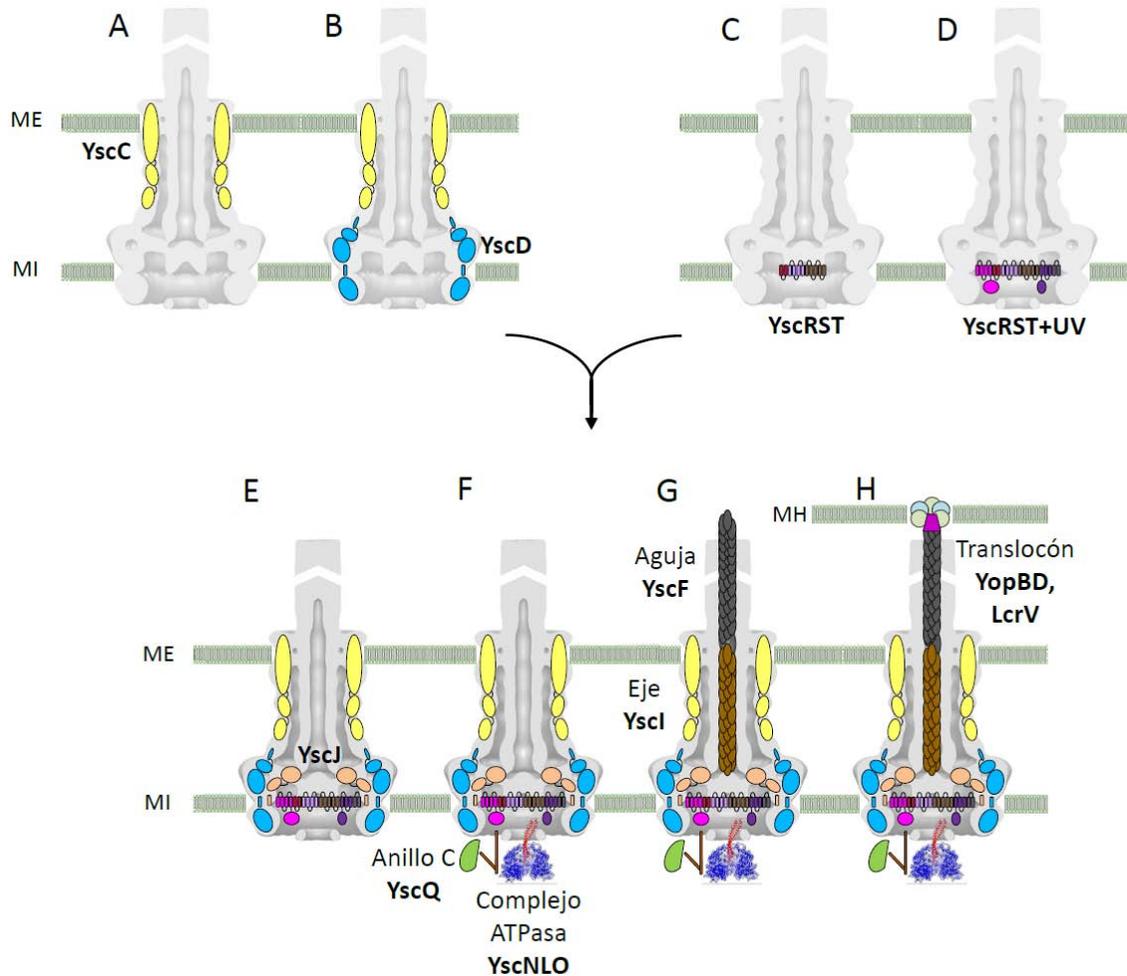


Figura 2. Modelo de ensamblaje del inyectisoma de *Yersinia*. (A) La rama de ensamblaje de la ME comienza con la formación del anillo oligomérico de la secretina YscC. (B) El anillo YscC sirve como punto de nucleación para la formación del anillo YscD. (C) Se incorporan en la MI las proteínas YscRST (D) Se promueve la oligomerización del anillo formado por YscV y la incorporación de YscU a la puerta de exportación. (E) Cuando ambas plataformas se encuentran en la membrana, el anillo YscJ une a las dos ramas. (F) El complejo ATPasa y el anillo C se ensamblan en la base del inyectisoma. (G) Se secretan los sustratos tempranos que forman el eje interno y la aguja. (H) Se ensambla el translocón que hace contacto con la célula hospedera para la translocación de los efectores.

Una vez que se secretan los sustratos tempranos, existe un cambio de especificidad de sustratos a nivel de la proteína YscU de la puerta de exportación. Esta proteína sufre un corte auto-proteolítico permitiendo el reconocimiento y la

salida de los sustratos intermedios o proteínas translocadoras que forman el poro de translocación [42,43].

Para que se lleve a cabo la translocación eficiente de efectores al interior de la célula eucarionte, se necesita la formación del poro de translocación. Por esta razón existe un complejo molecular (formado en *Yersinia* por las proteínas YopN-TyeA-YscB-SycN) que previene la secreción de efectores hasta que el poro de translocación se ha formado, es decir, hasta que la bacteria ha establecido contacto con la célula hospedera [44]. Una vez que se ha formado en la parte distal de la aguja el complejo translocón y éste ha hecho contacto con la célula hospedera, el proceso de secreción culmina con la translocación de efectores a la célula infectada [15,42].

La otra historia: Controlando al inyectisoma

El conocimiento acerca del inyectisoma bacteriano que se ha generado en los últimos años no sólo ha permitido entender los mecanismos de patogénesis de numerosos agentes infecciosos, sino que también ha posibilitado el manipular a merced este dispositivo, abriendo así las puertas para aplicaciones en el campo de la industria y la medicina.

Las proteínas destinadas a ser secretadas a través del SST3 poseen una señal discreta en la región amino terminal que las dirige hacia el complejo ATPasa de la maquinaria de secreción. Cuando esta secuencia se fusiona en el amino terminal de proteínas heterólogas, la secuencia de señalización puede dirigir a la proteína de fusión al inyectisoma para ser secretada [45]. Esta particularidad se ha aprovechado para reprogramar un dispositivo molecular existente, como lo es el inyectisoma, para secretar biomateriales de interés comercial como se describe a continuación.

Exportando seda de araña a través del inyectisoma de *Salmonella*

La sobreproducción de ciertas proteínas recombinantes en bacterias puede llevar a la formación de cuerpos de inclusión dentro de la célula, comprometiendo de ese modo el rendimiento en la purificación de la proteína recombinante. La exportación de proteínas al medio extracelular es una herramienta importante en bioingeniería, que evita que se formen cuerpos de inclusión. La secreción también es sumamente deseable cuando la función de la proteína recombinante de interés

requiere estar en el ambiente extracelular (celulasas, enzimas que degradan polímeros, etc.) [45].

De esta forma, empleando a *Salmonella* como chasis y a la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) de este patógeno como herramienta biológica, Voigt *et al.* construyeron un sistema que contiene todos los componentes genéticos necesarios para la secreción de proteínas heterólogas al exterior de la bacteria [45]. Como prueba de concepto, usaron el sistema diseñado con el fin de exportar al medio una mezcla de tres monómeros (ADF-1, ADF-2 y ADF-3) que componen a un tipo sintético de fibra de seda de araña, a los que se les fusionó la secuencia de secreción del efector SptP de *Salmonella* en el N-terminal. Debido a que es sumamente fuerte y elástica, la seda de araña es un biomaterial con aplicaciones tecno-industriales. Sin embargo, la producción recombinante de proteínas de seda de araña se ha visto limitada a causa de la tendencia a formar agregados y fibras si se les confina dentro de la célula productora [45,46].

Las proteínas heterólogas se secretaron específicamente por el SST3 de *Salmonella*. Se consiguieron tasas de secreción de hasta $1.8 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y se demostró la secreción de hasta el 14% de la proteína recombinante producida.

Optimizando la purificación de neuropéptidos con el SST3

En la industria médica hay un interés creciente en la obtención de polipéptidos farmacológicamente activos debido a su utilidad como ligandos en aplicaciones terapéuticas. Una de estas biomoléculas son las conotoxinas, péptidos neurotóxicos aislados del caracol del género *Conus* que actúan sobre canales iónicos inhibiendo así vías asociadas al dolor. Por esta razón han mostrado ser un potente agente analgésico con mínimos efectos secundarios [47].

Este tipo de neuropéptidos tiende a formar agregados intermoleculares en el citoplasma cuando su nivel de expresión es alto, complicando la recuperación de los mismos en su forma activa [48]. Por esta razón, Hughes *et al.* explotaron el sistema de secreción tipo 3 flagelar para exportar selectivamente conotoxinas producidas de manera heteróloga en *Salmonella* entérica al medio extracelular, con el fin de evitar la acumulación intracelular del péptido producido y la subsecuente formación de cuerpos de inclusión [48].

Al igual que los efectores de virulencia, la especificidad para la secreción de sustratos flagelares está determinada principalmente por una señal peptídica de

estructura desordenada en el N-terminal y se requiere también la presencia de chaperonas específicas para facilitar la secreción [49]. En el trabajo mencionado, se fusionó la μ -conotoxina SIIIA (neuropéptido de 22 aminoácidos) con polihistidinas al carboxilo terminal del sustrato de secreción flagelar FlgM (proteína que actúa como regulador de la transcripción de genes flagelares al unirse e inhibir específicamente al factor sigma σ^{28} [50]. Para escindir al neuropéptido de la proteína FlgM se insertó un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV.

Los resultados obtenidos mostraron que la conotoxina se secreta eficientemente al medio. Adicionalmente, la fusión recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel y se digirió con la proteasa TEV. Se probó la actividad biológica de la conotoxina recombinante secretada por *Salmonella* sobre ovocitos de *Xenopus* que expresan al canal de sodio de rata $Na_v1.2$, obteniendo que ésta resultó prácticamente igual a la del polipéptido sintetizado químicamente [48].

A diferencia de los métodos tradicionales de purificación de neuropéptidos, este sistema tiene la ventaja de que, al ser secretado el péptido recombinante al medio extracelular, no es necesario lisar a las células, es suficiente centrifugar el cultivo y filtrar el sobrenadante para purificar al neuropéptido acumulado en el medio.

El uso del inyectisoma como una nueva estrategia para la vacunación

Algunos patógenos intracelulares con inyectisoma como *Salmonella* tienen capacidad invasiva para acceder al citosol de células hospederas. Explotando esta característica, cepas atenuadas de este patógeno se han empleado como vectores para expresar y presentar antígenos heterólogos derivados de virus, bacterias u hongos parasíticos, a células presentadoras de antígenos (CPA) con el fin de provocar la producción de anticuerpos específicos [51].

La secreción de antígenos heterólogos a través del inyectisoma de cepas atenuadas de *Salmonella* ha mostrado ser una estrategia más eficaz que la sola expresión y presentación del antígeno heterólogo en la membrana bacteriana ya que, siendo secretado al citoplasma de las CPAs, el antígeno es capaz de estimular la respuesta de los linfocitos T citotóxicos de manera más efectiva [52,53]. Sin embargo, una desventaja importante de esta estrategia de vacunación es que el empleo de bacterias atenuadas restringe su uso en niños y en individuos

inmunocomprometidos debido al riesgo de virulencia residual en las cepas patógenas [54].

Para disponer de un vehículo seguro para la entrega de antígenos a CPAs, Galán *et al.* modificaron genéticamente a *Salmonella entérica* para producir minicélulas no replicativas que fungieran como chasis biológico para un inyectisoma activo [54]. Las minicélulas bacterianas son vesículas acromosomales, resultado de un mecanismo de división celular aberrante [55]. Las minicélulas contienen todos los componentes moleculares de la célula parental (RNA, complejos proteicos, plásmidos, etc.), por lo que pueden sintetizar proteínas y sostener un gradiente electroquímico (requisitos necesarios para el funcionamiento del inyectisoma), sin embargo no son agentes infecciosos.

En ese trabajo, las minicélulas se aislaron generando una mutante nula de *S. enterica* en el gen *minD* (cuyo producto se requiere para la adecuada división celular). Posteriormente se verificó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, la presencia de componentes del SST3 de la SPI-1 en las preparaciones de mini-células purificadas. Asimismo mediante microscopía electrónica se corroboró la presencia de inyectisomas ensamblados en la superficie de las mini-células. Por último, para determinar si estos inyectisomas eran capaces de entregar antígenos heterólogos como lo hacen las cepas de *Salmonella* atenuadas, los primeros 104 aminoácidos del efector SopE, que contienen la señal para ser secretado vía SST3, se fusionaron al N-terminal del antígeno OVA. Las mini-células transformadas con una construcción que expresa al antígeno quimérico se incubaron con células murinas de la línea RMA. Los inyectisomas de estas mini-células fueron totalmente funcionales ya que lograron translocar el antígeno quimérico al interior de las células murinas [54].

Conclusión

El sistema de secreción tipo III bacteriano ha sido objeto de intenso estudio en los últimos años. Esto nos ha permitido entender la relación huésped bacteriano – hospedero eucarionte a nivel molecular.

El conocer los procesos generales de especificidad, reconocimiento y translocación de sustratos vía SST3 nos permite manipular dicha maquinaria molecular para la secreción y/o translocación a células eucariontes de diversas proteínas. También, el entendimiento de este sistema ha sido empleado para desarrollar nuevos compuestos que inhiben el SST3 desarmando específicamente

a las bacterias que hacen uso de esta maquinaria [56-60]. Los factores de virulencia -como el SST3- son blancos terapéuticos atractivos, ya que los inhibidores de estos podrían abatir la patogenicidad sin causar la muerte de la bacteria, evitando así ejercer una presión selectiva para el desarrollo de resistencias a estos nuevos compuestos. De esta forma, la inhibición del SST3 puede constituir una importante estrategia alternativa al uso de antibióticos convencionales.

A la fecha, sin embargo, hay aún componentes estructurales en los inyectisomas bacterianos cuya función precisa se desconoce. Caracterizar estas piezas de función desconocida daría pauta a una mejor y más completa comprensión de la estructura y del funcionamiento de esta máquina molecular. Otra de las grandes incógnitas acerca del funcionamiento del inyectisoma es cómo esta maquinaria regula la jerarquía de secreción para su autoensamblado con tal precisión.

Actualmente en el laboratorio, empleando el inyectisoma de *Escherichia coli* enteropatógena como modelo, estamos trabajando para descifrar los mecanismos de jerarquización en la secreción de sustratos así como en la dilucidación del papel de marcos de lectura abiertos sin función asignada en la biogénesis del inyectisoma de este patógeno de humanos.

Referencias

1. World Health Organisation (2004) The global burden of disease 2004. *Update* **1**, 160
2. Cornelis, G. R. (2006). *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 811–825
3. Chatterjee, S., Chaudhury, S., McShan, A. C., Kaur, K., and De Guzman, R. N. (2013). *Biochemistry* **52**, 2508–17
4. Stephens, R. S. (1998). *Science (80-)*. **282**, 754–759
5. Gophna, U., Ron, E. Z., and Graur, D. (2003). *Gene* **312**, 151–163
6. Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., and Tschäpe, H. (1997). *Mol. Microbiol.* **23**, 1089–97
7. Nguyen, L., Paulsen, I. T., Tchieu, J., Hueck, C. J., and Saier, M. H. (2000). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 125–44
8. Kawamoto, A., Morimoto, Y. V., Miyata, T., Minamino, T., Hughes, K. T., Kato, T., and Namba, K. (2013). *Sci. Rep.* **3**, 3369
9. Abby, S. S., and Rocha, E. P. C. (2012). *PLoS Genet.* **8**, e1002983
10. Haensch, S., Bianucci, R., Signoli, M., Rajerison, M., Schultz, M., Kacki, S., Vermunt, M., Weston, D. A., Hurst, D., Achtman, M., Carniel, E., and Bramanti, B. (2010). *PLoS Pathog.* **6**, e1001134

11. Bos, K. I., Schuenemann, V. J., Golding, G. B., Burbano, H. A., Waglechner, N., Coombes, B. K., McPhee, J. B., DeWitte, S. N., Meyer, M., Schmedes, S., Wood, J., Earn, D. J. D., Herring, D. A., Bauer, P., Poinar, H. N., and Krause, J. (2011). *Nature* **478**, 506–10
12. Alesina, A. (2013). *Science* **342**, 427–8
13. Cornelis, G. R. (2002). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 742–52
14. Shannon, J. G., Hasenkrug, A. M., Dorward, D. W., Nair, V., Carmody, A. B., and Hinnebusch, B. J. (2013). *MBio* **4**, e00170–13
15. Büttner, D. (2012). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 262–310
16. Kosarewicz, A., Königsmaier, L., and Marlovits, T. C. (2012). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**, 1140–54
17. Hueck, C. J. (1998). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379–433
18. Nataro, J. P., and Kaper, J. B. (1998). *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142–201
19. Daniell, S. J., Takahashi, N., Wilson, R., Friedberg, D., Rosenshine, I., Booy, F. P., Shaw, R. K., Knutton, S., Frankel, G., and Aizawa, S. (2001). *Cell. Microbiol.* **3**, 865–871
20. Wilson, R. K., Shaw, R. K., Daniell, S., Knutton, S., and Frankel, G. (2001). *Cell. Microbiol.* **3**, 753–762
21. Daniell, S. J., Kocsis, E., Morris, E., Knutton, S., Booy, F. P., and Frankel, G. (2003). *Mol. Microbiol.* **49**, 301–8
22. Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G., and Frankel, G. (1998). *EMBO J.* **17**, 2166–76
23. Yip, C. K., and Strynadka, N. C. J. (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 223–30
24. Gauthier, A., Puente, J. L., and Finlay, B. B. (2003) *Infection and Immunity* **71**, 3310–3319.
25. Spreter, T., Yip, C. K., Sanowar, S., André, I., Kimbrough, T. G., Vuckovic, M., Pfuetzner, R. A., Deng, W., Yu, A. C., Finlay, B. B., Baker, D., Miller, S. I., and Strynadka, N. C. J. (2009). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 468–76
26. Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Finlay, B. B., Miller, S. I., and Strynadka, N. C. J. (2005). *Nature* **435**, 702–7
27. Sal-Man, N., Deng, W., and Finlay, B. B. (2012). *Biochem. J.* **442**, 119–25
28. Worrall, L. J., Lameignere, E., and Strynadka, N. C. J. (2011) Structural overview of the bacterial injectisome. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 3–8
29. Monjarás Ferial, J., García-Gómez, E., Espinosa, N., Minamino, T., Namba, K., and González-Pedrajo, B. (2012). *J. Bacteriol.* **194**, 6029–45
30. Diepold, A., Wiesand, U., and Cornelis, G. R. (2011). *Mol. Microbiol.* **82**, 502–14
31. Wagner, S., Königsmaier, L., Lara-Tejero, M., Lefebvre, M., Marlovits, T. C., and Galán, J. E. (2010). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17745–17750
32. Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B. B., and Strynadka, N. C. J. (2007). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 131–7
33. Stebbins, C. E., and Galán, J. E. (2001). *Nature* **414**, 77–81
34. Birtalan, S. C., Phillips, R. M., and Ghosh, P. (2002). *Mol. Cell* **9**, 971–980

35. Akeda, Y., and Galán, J. E. (2005). *Nature* **437**, 911–5
36. Biemans-Oldehinkel, E., Sal-Man, N., Deng, W., Foster, L. J., and Finlay, B. B. (2011). *J. Bacteriol.* **193**, 5514–9
37. Minamino, T., and MacNab, R. M. (2000). *Mol. Microbiol.* **37**, 1494–503
38. Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X., and Galán, J. E. (2011). *Science* (80-.). **331**, 1188–1191
39. Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., and Cornelis, G. R. (2010). *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* **29**, 1928–1940
40. Diepold, A., Wiesand, U., Amstutz, M., and Cornelis, G. R. (2012). *Mol. Microbiol.* **85**, 878–92
41. Gauthier, A., Puente, J. L., and Finlay, B. B. (2003). *Infect. Immun.* **71**, 3310–3319
42. Deane, J. E., Abrusci, P., Johnson, S., and Lea, S. M. (2010). *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1065–75
43. Zarivach, R., Deng, W., Vuckovic, M., Felise, H. B., Nguyen, H. V., Miller, S. I., Finlay, B. B., and Strynadka, N. C. J. (2008). *Nature* **453**, 124–7
44. Day, J. B., and Plano, G. V. (1998) A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* **30**, 777–788
45. Widmaier, D. M., Tullman-Ercek, D., Mirsky, E. A., Hill, R., Govindarajan, S., Minshull, J., and Voigt, C. A. (2009). *Mol. Syst. Biol.* **5**, 309
46. Huemmerich, D., Helsen, C. W., Quedzuweit, S., Oschmann, J., Rudolph, R., and Scheibel, T. (2004). *Biochemistry* **43**, 13604–12
47. Vetter, I., and Lewis, R. J. (2012). *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 1546–52
48. Singer, H. M., Erhardt, M., Steiner, A. M., Zhang, M.-M., Yoshikami, D., Bulaj, G., Olivera, B. M., and Hughes, K. T. (2012). *MBio* **3** e00115-12
49. Hirano, T., Minamino, T., Namba, K., and Macnab, R. M. (2003). *J. Bacteriol.* **185**, 2485–92
50. Chilcott, G. S., and Hughes, K. T. (1998). *Mol. Microbiol.* **30**, 1029–1040
51. Garmory, H. S., Brown, K. A., and Titball, R. W. (2002). *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 339–53
52. Rüssmann, H. (2004). *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 565–9
53. Hegazy, W. A. H., and Hensel, M. (2012). *Future Microbiol.* **7**, 111–27
54. Carleton, H. a, Lara-Tejero, M., Liu, X., and Galán, J. E. (2013). *Nat. Commun.* **4**, 1590
55. Khachatourians, G. G., Clark, D. J., Adler, H. I., and Hardigree, A. A. (1973). *J. Bacteriol.* **116**, 226–9
56. Keyser, P., Elofsson, M., Rosell, S., and Wolf-Watz, H. (2008). *J. Intern. Med.* **264**, 17–29
57. Veenendaal, A. K. J., Sundin, C., and Blocker, A. J. (2009). *J. Bacteriol.* **191**, 563–70
58. Aiello, D., Williams, J. D., Majgier-Baranowska, H., Patel, I., Peet, N. P., Huang, J., Lory, S., Bowlin, T. L., and Moir, D. T. (2010). *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1988–99

59. Kimura, K., Iwatsuki, M., Nagai, T., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Shiomi, K., Omura, S., and Abe, A. (2011). *J. Antibiot. (Tokyo)*. **64**, 197–203
60. Duncan, M. C., Linington, R. G., and Auerbuch, V. (2012). *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 5433–41
61. Pallen, M. J., Beatson, S. A., and Bailey, C. M. (2005). *BMC Microbiol.* **21**, 9–12

Semblanza de la Dra. Bertha González Pedrajo.



Bertha González Pedrajo es Bióloga (Facultad de Ciencias) así como Maestra y Doctora en Investigación Biomédica Básica (UACPyP del CCH) por la Universidad Nacional Autónoma de México. Realizó una estancia posdoctoral en la Universidad de Yale E.U., estudiando el sistema de exportación de proteínas flagelares en *Salmonella enterica*. Actualmente es Investigadora Titular B en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y su principal interés en investigación se centra en conocer los mecanismos moleculares mediante los que ocurre la secreción de efectores de virulencia en *Escherichia coli* enteropatógena. Ha publicado más de una veintena de artículos de investigación original con más de 500 citas a su trabajo. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores desde 1998. Ha dirigido 5 tesis de licenciatura, 5 de maestría y 3 de doctorado. Su trabajo de investigación ha sido financiado por el CONACYT, la DGAPA (UNAM) y por la Fundación Miguel Alemán.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico, Vol. XLI**, 85-102, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

A 30 AÑOS DEL DESCUBRIMIENTO DE *Helicobacter pylori*. USO DE PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE TERAPIAS

30 YEARS SINCE THE DISCOVERY OF *Helicobacter pylori*. USE OF MEDICINAL PLANTS AS A SOURCE OF THERAPIES

Jazmín Espinosa Rivero e Irma Romero Álvarez

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional
Autónoma de México

Ciudad Universitaria, CP 04510, México, D.F. México

irma@bq.unam.mx

Resumen

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, que coloniza la mucosa gástrica del humano. Se ha asociado su infección con gastritis crónica, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico. El 50% de la población mundial está infectada y en México se ha reportado una seroprevalencia del 66%. *H. pylori* ha desarrollado mecanismos de colonización y virulencia que aseguran el éxito en el establecimiento de su nicho. Esto desencadena una respuesta local y sistémica

por parte del sistema inmune, no obstante, la bacteria puede modular esta reacción e infectar a su hospedero de manera crónica. Las terapias para erradicar a la bacteria son efectivas en el 80% de los casos, sin embargo, son caras y generan efectos secundarios, por lo que el paciente abandona el tratamiento, favoreciendo la reincidencia de la infección y la resistencia bacteriana. De tal manera que resulta imprescindible la búsqueda de nuevos tratamientos y/o compuestos para prevenir y controlar las enfermedades relacionadas con *H. pylori*. Nuestro grupo de trabajo ha buscado estas alternativas con base en el conocimiento tradicional de las plantas medicinales mexicanas y se han abordado diferentes estrategias como son la identificación de compuestos activos contra la bacteria a partir de plantas medicinales, el estudio de extractos con efectos polifarmacológicos que no solo eliminan a la bacteria, sino que también incidan sobre la sintomatología asociada y, finalmente, la identificación de extractos y compuestos de las plantas capaces de inhibir los procesos de colonización de la bacteria.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, plantas medicinales, antibiótico, gastroprotección, colonización.

Abstract

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium that colonizes the human gastric mucosa. Its infection has been associated with chronic gastritis, peptic ulcer, and gastric adenocarcinoma. Half of the world's population is infected; in Mexico, a 66% seroprevalence has been reported. *H. pylori* has developed colonization and virulence mechanisms that ensure its establishment in its niche. This triggers a host local and systemic immune response; however, the bacterium can modulate this reaction making a chronic infection. Therapies to eradicate the bacteria are effective in 80% of cases; however, they are expensive and produce many side effects, making the patient leaves the treatment, promoting the infection recurrence and bacterial resistance. Consequently, the development of new therapeutic modalities or compounds to prevent and treat *H. pylori* related diseases is essential. Our group has sought these alternatives based on traditional knowledge of Mexican medicinal plants and have addressed different strategies such as the identification of active compounds against the bacteria from medicinal plants, the study of extracts with polypharmacologic effects that not only kills the bacteria but also impact on the associated symptoms, and the identification of

extracts and plant compounds capable of inhibiting the bacterial colonization process, thereby helping in the prophylaxis of the diseases.

Keywords: *Helicobacter pylori*, medicinal plants, antibiotic, gastroprotection, colonization.

Antecedentes históricos

Durante el siglo pasado se creía que la gastritis y las úlceras pépticas eran producto de la hipersecreción de ácido gástrico, fruto de una vida estresada, pero a principios de los años 80, un hallazgo de dos médicos australianos cambió radicalmente la historia natural de las enfermedades pépticas. El patólogo Robin Warren observó a una bacteria en el tejido inflamado de la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica y meses después Barry Marshall, gastroenterólogo, logró cultivarla. En 1983, publicaron en *The Lancet* [1], la presencia en la mucosa gástrica de un bacilo curvado, microaerófilo, Gram negativo y lo asociaron a la gastritis y úlcera, al cual llamaron posteriormente *Campylobacter pyloridis*. En 1989, la bacteria se reclasificó como *Helicobacter pylori* [2] y el 3 de octubre de 2005, la Asamblea Nobel le concedió a estos investigadores el Premio Nobel en Fisiología o Medicina por el descubrimiento de *H. pylori* y su papel en la gastritis y la úlcera péptica.

El descubrimiento de *H. pylori* y su asociación con la infección persistente y estas enfermedades fue tomado con escepticismo al principio, sin embargo, los estudios que se han realizado al respecto han revolucionado la manera de entender la enfermedades pépticas y han permitido que los tratamientos médicos sean más efectivos.

Generalidades

H. pylori es una bacteria flagelada, de forma espiral, Gram negativa, microaerofílica, de lento crecimiento, cuyo principal reservorio es el estómago humano, se localiza principalmente en la superficie del epitelio gástrico, en las regiones del antro y píloro. Se caracteriza por sobrevivir en condiciones de pH ácido gracias a la potente enzima ureasa. *H. pylori* es probablemente la infección bacteriana más común en los humanos, presente en la mitad de la población mundial. La presencia de esta bacteria se asocia con gastritis crónica activa, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma MALT [3]. La prevalencia de la

infección depende de factores socioeconómicos y de la infraestructura sanitaria, calculándose que en países en desarrollo la incidencia puede llegar al 90%; en México se ha reportado una seroprevalencia del 66% [4]. Por lo que las enfermedades producidas por la bacteria representan un problema de salud mundial.

Con la secuenciación de su genoma completo se han comprendido mejor su metabolismo y patogénesis [5]. Se han identificado más de 300 genes involucrados en el éxito de la colonización del ambiente ácido del estómago humano, medio hostil para la mayoría de los organismos [6], entre ellos adhesinas, lipoproteínas y otras proteínas de membrana externa, recalcando la complejidad de la interacción patógeno-huésped.

Se sabe que existen al menos 20 adhesinas que permiten la íntima interacción de la bacteria con la célula gástrica [7], dos de ellas han sido exhaustivamente analizadas; SabA, que interactúa con ácido siálico, y BabA, que se une con los azúcares presentes en los antígenos Lewis B [8, 9]. La adhesión de la bacteria a la mucosa gástrica está mediada por glicoconjugados y constituyen un paso determinante en su establecimiento.

Factores de virulencia.

Esta bacteria se ha especializado para vivir y persistir en un ambiente hostil como lo es el estómago humano, para lograrlo, emplea distintos factores de virulencia (Fig. 1) entre los que se encuentran:

Enzima Ureasa. Codificada por un conjunto de genes, cataliza una reacción donde la urea producida por nuestro organismo es convertida en NH_3 y CO_2 , aumentando el pH alrededor de la bacteria, así como del periplasma creando un ambiente alcalino, que protege a la bacteria del ácido gástrico. Además, se tiene evidencia que esta enzima provoca apoptosis en células gástricas *in vitro* [10].

Citotoxina vacuolizante Vac A. Es una proteína que forma poros en las células epiteliales del estómago, permitiendo la salida de aniones y urea. Otras funciones que se le han propuesto son la desorganización de la polaridad celular, promueve la apoptosis de células epiteliales e inhibe la proliferación de las células T y sus funciones efectoras. Todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen que codifica para Vac A, sin embargo, variantes en la secuencia de algunos de sus

dominios están ligadas a variaciones en la severidad de las enfermedades provocadas por *H. pylori* [11].

Productos de genes de la isla de patogenicidad cagPAI. Este segmento del genoma tiene 31 genes dentro de los cuales destaca el que codifica para la proteína Cag A, la cual después de ser transportada por un sistema de secreción tipo IV (también codificado por la isla) a las células epiteliales del hospedero, induce en ellas múltiples cambios en el citoesqueleto, activan a las proteínas cinasas activadoras de mitosis MAPK, que regulan la proliferación celular, diferenciación, respuestas inflamatorias y finalmente conducen a apoptosis. No se conocen proteínas homólogas a esta en otras especies de *Helicobacter*, lo cual indica una alta especificidad de infección a los humanos. Las cepas de *H. pylori* que expresan Cag A se asocian con un incremento de riesgo de cáncer gástrico [12].

Lipopolisacárido. El lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de *H. pylori*, es otro mediador de la inflamación y respuesta inmune del hospedero, debido a la activación de células fagocíticas, endoteliales, epiteliales y linfocitos. Posee antígenos Lewis X y Y como componentes del antígeno O del propio LPS, con los que mimetiza a las células del hospedero y logra evitar su eliminación [13].

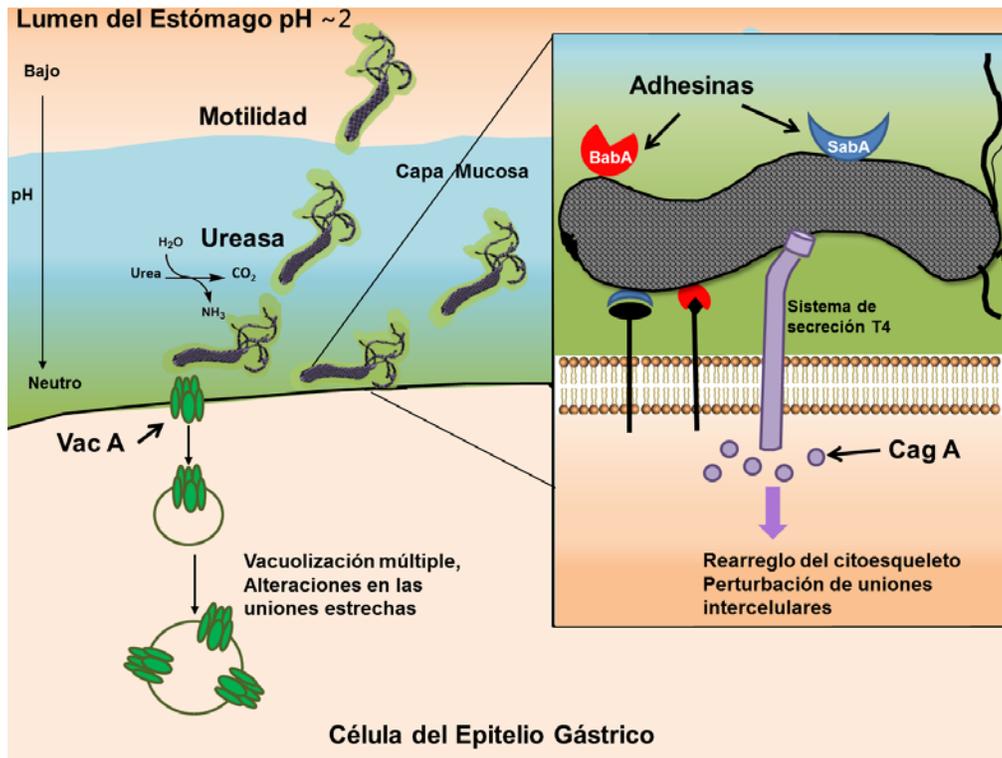


Figura 1. Mecanismos de colonización y factores de virulencia de *H. pylori*

Respuesta del Huésped.

En prácticamente todas las personas infectadas, *H. pylori* provoca un proceso inflamatorio en la mucosa gástrica. Esta respuesta consiste en el reclutamiento de neutrófilos, seguida de linfocitos T y B, células plasmáticas, y macrófagos junto al daño celular. *H. pylori* ha evolucionado por medio de complejas estrategias para mantener una inflamación moderada en la mucosa gástrica, limitando la magnitud de la actividad efectora del sistema inmune del hospedero y evadiéndola [14].

La respuesta inmune del hospedero frente *H. pylori* es, en principio, semejante a la que se da ante cualquier patógeno, una respuesta innata inespecífica que responde rápidamente contra diversas moléculas bacterianas, para eliminar a la bacteria y una adaptativa retardada, que permite la activación de células T- o B- y de memoria mediante la producción de inmunoglobulinas (lo que se define como del tipo celular y del tipo humoral, respectivamente) y es activada por la respuesta innata. Sin embargo, esta bacteria logra evadir de varias maneras a la respuesta innata del hospedero. Por un lado, el LPS y la flagelina de *H. pylori* son activadores pobres de los receptores del reconocimiento del huésped TLR-4 y

TLR- 5, respectivamente, a diferencia de los de otras bacterias Gram negativas [15]. Por otra parte, *H. pylori* puede sobrevivir intracelularmente dentro de los macrófagos, interfiriendo con el efecto de las enzimas lisosomales [16]. Por lo tanto, a pesar de darse una respuesta innata contra la bacteria, esta no es lo suficientemente efectiva para eliminar la infección.

El sello distintivo de la interacción entre *H. pylori* y el sistema inmune del huésped es la persistencia de la infección por años, lo que lleva a una inflamación crónica de la mucosa gástrica. Una vez establecida la infección por *H. pylori*, la inmunidad adaptativa se desarrolla: las células T cooperadoras o Th (del inglés *T helper*) CD4+ se diferencian en células Th efectoras (respuesta celular) y las células B, que producen anticuerpos específicos, se activan (respuesta humoral). Sin embargo, hay evidencia que indica que las células B y los anticuerpos son prescindibles para el control de *H. pylori*, mientras que los subconjuntos de células T efectoras, Th1 y Th17 y sus citocinas, son esenciales para el control de la infección. Las células Th1 producen las citocinas pro-inflamatorias interferón gamma (IFN- γ) y los factores de necrosis tumoral α y β que estimulan la respuesta inmunitaria innata y de las células T. Las células Th17 son una clase, recientemente identificadas, de las células T efectoras que producen la citocina pro-inflamatoria IL-17. Esta interleucina estimula a los fibroblastos, a las células endoteliales y epiteliales y a las células mononucleares de la lámina propia y gástricas para producir una diversidad de citocinas y quimiocinas; este proceso da como resultado la infiltración de neutrófilos que contribuye a la inflamación asociada a *H. pylori* [15]. A pesar de la respuesta local y sistémica contra la infección, *H. pylori* puede trastornar y/o modular la inmunidad adaptativa perpetuando la infección y la inflamación crónica.

Las células T reguladoras (Treg) son células T CD4+ CD25+ FOXP3 que contribuyen a la tolerancia inmunológica periférica mediante la supresión de las células T activadas, células asesinas naturales, células B y células dendríticas. Las células Treg son inducidas por la IL-18 en respuesta a *H. pylori* y regulan a las células T efectoras para evitar la activación excesiva y promover una infección persistente [14].

Además de sobrevivir a la respuesta inmune innata, *H. pylori* también ha evolucionado para enfrentar la respuesta adaptativa y es capaz de bloquear la proliferación de células T dependiente de antígenos, mediante la producción de Vac A, interfiriendo con la vía de señalización de IL-2. También se propone que este efecto inmunomodulador involucra la interacción directa con las células T y

con una interferencia de Vac A con la presentación de antígeno, mediada por el complejo principal de histocompatibilidad II [11,15].

Consecuencias clínicas de la infección.

Aunque aproximadamente la mitad de la población humana esta colonizado por *H. pylori*, la gran mayoría de los infectados será asintomático y no tendrá ningún tipo de complicaciones clínicamente significativas. Sólo alrededor del 10 al 20% son propensos a desarrollar úlcera péptica (duodenales o gástricas), del 1 al 3% están en riesgo de cáncer gástrico y menos del 0.01% a desarrollar linfoma tipo MALT [17, 18].

El daño básico que media la infección por *H. pylori*, es la **gastritis**, la cual se refiere a una inflamación en la mucosa gástrica, asociada a mecanismos inmunes como ya se mencionó. Muchas personas con gastritis no tienen ningún tipo de síntomas; sin embargo, otras presentan ardor o dolor en la parte superior del abdomen, náuseas, vómitos o inapetencia. Cabe hacer notar que la gastritis aguda puede ser producida por otras causas como los antiinflamatorios no esteroideos, consumo excesivo de irritantes, alcohol o tabaquismo. Si la gastritis es de corta duración, se denomina gastritis aguda, pero cuando la infección por la bacteria persiste (meses e incluso años), se presenta la **gastritis crónica**. La gastritis crónica se caracteriza por el arribo de linfocitos y células plasmáticas a la mucosa, en respuesta a la alta producción de citocinas durante un periodo prolongado. Está asociada a la atrofia de la mucosa y metaplasia intestinal, pero sin provocar erosiones [3].

La enfermedad ulcerosa péptica se caracteriza por una lesión puntual en la mucosa que se extiende más allá de la *muscularis mucosae* y es secundaria a la secreción gástrica de pepsina y ácido. Se produce daño vascular, que origina isquemia de la mucosa, disminución en el aporte de nutrientes y la formación de radicales libres, que como consecuencia, producen necrosis en el tejido y promueven una respuesta inflamatoria. El cuadro clínico de la úlcera péptica se caracteriza por dolor abdominal de tipo ardoroso y punzante localizado en la boca del estómago, acompañado de sensación de hambre o vacío, náuseas y vómito. Las úlceras pépticas se clasifican en úlceras gástricas y duodenales. *H. pylori* es responsable de casi 95% de las duodenales y de 80% de las gástricas. Las complicaciones son en el 15-20% de los casos la hemorragia y en el 2-10% la perforación y obstrucción digestiva, las cuales, de no tratarse a tiempo resultan mortales para el paciente [3].

En la menor parte de los infectados por *H. pylori* se desarrolla **cáncer gástrico**, que es un tipo de crecimiento celular maligno que se origina en el epitelio del estómago, con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos y órganos. A nivel mundial es la 6ª neoplasia maligna más común y la 3ª causa de muerte por cánceres [19]. El adenocarcinoma se desarrolla de una secuencia de lesiones que incluyen la inflamación crónica no atrófica (principalmente en el corpus), gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y carcinoma. Se caracteriza por hipo y aclorhidria, niveles altos de gastrina y una baja relación de pepsinogeno I/II. Se ha observado que los sujetos que desarrollan úlceras pépticas no llegan a presentar cáncer gástrico, lo que indica caminos divergentes en estas patologías [3].

El riesgo, de desarrollar alguna de estas patologías en los pacientes infectados varía ampliamente en el tipo de población que se trate y dependerá principalmente de factores inherentes de la cepa bacteriana y de factores del hospedero como su fisiología, genética y hábitos (dieta, ingesta de alcohol y tabaquismo) [18]. Sin embargo, no todas las cepas de *H. pylori* son patógenas, se ha observado que algunas evitan la aparición de enfermedades gástricas superiores, como reflujo, cáncer de esófago y síndrome de Barret; pero el uso desmedido de antibióticos ha provocado la selección de cepas patógenas [20].

Tratamiento de la Infección.

Actualmente no se tiene una vacuna contra *H. pylori* por lo que no existe una guía para la prevención de la infección, a excepción de las normas básicas de higiene.

El tratamiento de primera elección para erradicar a *H. pylori* es la Triple Terapia integrada por un inhibidor de la bomba de protones y 2 antibióticos (a elegir de amoxicilina, claritromicina, metronidazol o tetraciclina) por 7 a 14 días. Esta terapia falla en más del 20%, principalmente debido a la resistencia de la bacteria frente a dichos antibióticos [3,18]. En la 2ª línea de tratamiento (Terapia Cuádruple) se utilizan 2 antibióticos diferentes a los utilizados en la primera, un inhibidor de la acidez y se adicionan sales de bismuto, administrados hasta por 21 días. En aquellos pacientes en los que la infección por *H. pylori* persiste tras un segundo curso de tratamiento los antibióticos alternativos para una 3ª línea de tratamiento son las quinolonas (levofloxacin, moxifloxacin), rifabutina y furazolidona [18, 21].

Debido a la complejidad de las terapias (3 o 4 fármacos administrados en repetidas dosis, durante un largo periodo de tiempo) y a que, generalmente tienen

efectos adversos, el paciente no llega a cumplir adecuadamente el tratamiento, provocando la aparición de resistencia a los antibióticos utilizados y disminuyendo sustancialmente la eficacia de la terapia. Por otra parte, y debido a las pobres condiciones sanitarias en los países en vías de desarrollo, el tratamiento presenta aún más dificultades debido a la recurrencia después de una terapia exitosa. Finalmente, el alto costo de la terapia anti-*H. pylori* puede implicar un gasto difícil de solventar para el paciente, conduciendo a la evolución de la infección en padecimientos más severos como la úlcera péptica y el cáncer [22].

De tal manera que es importante buscar nuevos tratamientos y/o compuestos para controlar estas enfermedades, que sean más específicas, menos tóxicas y de fácil acceso a la población.

Plantas en el tratamiento para las enfermedades producidas por *H. pylori*

Los productos naturales, en particular los de las plantas, han desempeñado un papel fundamental para el desarrollo de fármacos. Por muchos años, la medicina tradicional ha utilizado diversas plantas para tratar la úlcera y la gastritis y este conocimiento ha sido la base para la búsqueda de agentes derivados de plantas para tratar dichas enfermedades.

Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en el estudio de la actividad anti-*H. pylori in vitro* de las plantas medicinales mexicanas con el objetivo de usar los extractos o compuesto aislados de las mismas, como posibles fármacos para el control de las enfermedades asociadas a esta bacteria.

Hemos analizado los extractos acuosos y metanólicos de 60 plantas y los resultados indicaron que el 77% de ellas tienen actividad contra *H. pylori*, en al menos uno de los extractos ensayados [23]. Una vez identificadas las plantas con mayor actividad antibiótica, se continuó con su estudio, por una parte, tratando de aislar los compuestos activos contra la bacteria y por el otro, estudiando los extractos de una manera integral, es decir si, además de tener actividad contra *H. pylori*, tienen otros efectos polifarmacológicos.

Por otra parte, y debido a que hasta la fecha no hay una vacuna contra *H. pylori*, se está investigando el efecto de los extractos y compuestos de las diferentes plantas en la inhibición de los procesos de colonización de esa bacteria, con lo cual se estaría incidiendo en la prevención o profilaxis de los padecimientos

que ocasiona. A continuación se presentan algunos de los resultados que hemos obtenido en cada una de estas líneas de trabajo.

1. Compuestos con actividad antibiótica.

Se ha logrado la identificación de compuestos con actividad antibiótica contra *H. pylori* (Fig. 2). La primera planta que se estudió fue el “cuachalalate”, *Amphipterygium adstringens*, debido a que es una de las especies más sobrecomercializadas y valoradas en nuestro país para el tratamiento de gastritis, ulcera péptica y cáncer gástrico [24]. A partir de su corteza se aislaron e identificaron a los ácidos anacárdicos como sus principales compuestos activos contra la bacteria [25]. Por otra parte, a partir de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana*, conocida como “estafiate”, se aislaron el flavonoide eupatilina [26] y la lactona sesquiterpénica, estafiatina [27]. Finalmente, de *Cyrtoarpa procera* comúnmente conocida como “chupandilla”, se aisló el β -sitosterol y una mezcla muy interesante de ácidos grasos que incorporan ciclopropano en su estructura [28], que actualmente se está terminando de caracterizar.

Todos estos compuestos presentan actividades inhibitorias del crecimiento de *H. pylori* mejores que el antibiótico metronidazol [Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de entre 10 y 31.2 $\mu\text{g/ml}$, comparadas con 250 $\mu\text{g/ml}$ del metronidazol] por lo que son moléculas que tienen el potencial para utilizarse como antibióticos en las terapias contra las enfermedades producidas por *H. pylori*. Este es el primer reporte de la actividad anti-*H. pylori* de estos compuestos aislados.

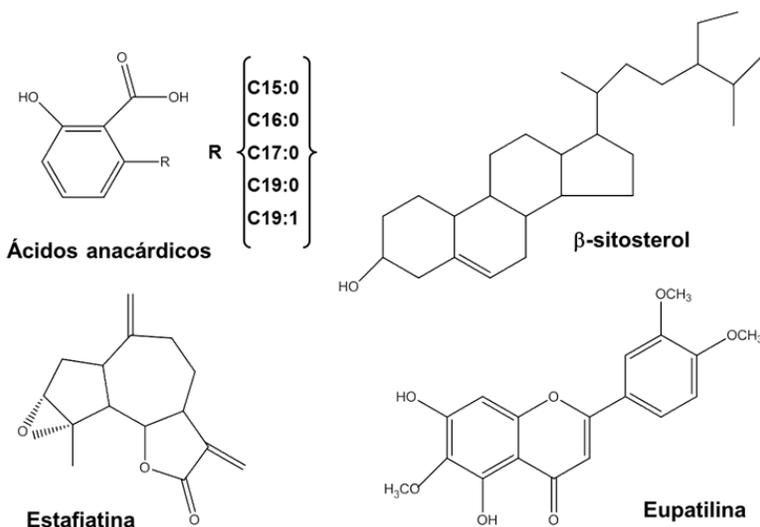


Figura 2. Compuestos con actividad anti-*H. pylori* aislados de plantas medicinales.

2. Extractos.

Se han identificado algunos extractos con propiedades polifarmacológicas, destacándose *Cyrtocarpa procera* [29]. Esta, es una especie endémica de México cuya corteza se emplea desde tiempos prehispánicos, en forma de decocción, para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, como la gastritis y la úlcera péptica [24]. Más recientemente, se ha reportado su uso como adulterante del cuachalalate [30].

A partir de la corteza de *C. procera*, se obtuvieron 5 distintos extractos [hexánico, diclorometánico, diclorometánico-metanólico 1:1, metanólico y acuoso], para abarcar toda la gama de polaridades y así obtener la mayor información posible acerca de los compuestos contenidos en la misma. A cada uno de ellos se le determinó su actividad anti-*H. pylori* y se evaluó su efecto en los siguientes modelos murinos agudos: toxicidad mediante la prueba de Lorke, úlcera inducida por etanol absoluto y edema auricular inducido por TPA [29] (Tabla I).

El análisis de resultados, permitió concluir que el extracto hexánico posee todas las actividades esperadas, sin embargo, una limitante para continuar su estudio es su bajo rendimiento. Por otro lado, el extracto metanólico posee la mejor actividad gastroprotectora, una buena actividad anti- *H. pylori*, y sobre todo, un buen rendimiento (13.2%), por lo que se continuó con su estudio.

Tabla I. Efectos farmacológicos de los extractos de *C. procera*

Extracto	Rendimiento (% peso seco)	ACTIVIDAD			
		Toxicidad aguda DL ₅₀ (mg/kg)	Anti- <i>H. pylori</i> (CMI µg/mL)	Antiinflamatoria DE ₅₀ (mg/oreja)	Gastroprotectora DE ₅₀ (mg/kg)
Hex	0.90	>5,000	7.81	1.75	1.06
DM	1.07		15.6	> 3	> 300
DM-Met	12.80		62.5	> 1	> 300
Met	13.22		62.5	> 1	0.53
Acuoso	17.74		125	> 1	11.30
Controles Positivos de Referencia			Metronidazol: 300 Claritromicina: 0.5 Amoxicilina: 0.05	Dexametasona: 0.05 Indometacina: 0.5	Carbenoxolona: 0.24

Hex: hexánico, DM: diclorometánico, DM-Met: diclorometánico-metanólico (1:1), Met: metanólico. En cuadros sombreados se presentan los resultados sobresalientes. Modificada de [29].

Se determinó que el mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de *C. procera* está mediado principalmente por la participación del óxido nítrico actuando sobre la vascularización de la mucosa gástrica, además de que se suma la participación parcial de otros mecanismos como las prostaglandinas con la concomitante producción de moco gástrico, los grupos sulfhidrilo y los canales de potasio dependientes de ATP [28].

Así mismo, se evaluó el efecto resolutorio del extracto metanólico sobre la úlcera gástrica inducida por etanol a ratones. Los resultados de administrar por 20 días el extracto, mostraron que es capaz de lograr un incremento significativo en la resolución de la úlcera, disminuyendo tanto en el número como la longitud de las úlceras (Fig. 3), resultados comparables con los obtenidos con el fármaco de referencia carbenoxolona. Así mismo, el análisis histopatológico e histoquímico fue confirmatorio para el efecto resolutorio [28].



Figura 3. Efecto resolutorio de la úlcera del extracto metanólico de *C. procera*. Las flechas en el control negativo indican las lesiones ulcerosas provocadas por la administración de etanol (Tomado de [28])

En resumen, los resultados obtenidos hasta el momento, destacan el potencial preclínico de *C. procera*, y en particular de su extracto metanólico, para reconocerla como candidata prometedora para el desarrollo de un tratamiento

integral para la gastritis o úlcera péptica, relacionados o no con *H. pylori*. Así mismo, estos resultados contribuyen a validar su uso tradicional.

3. Efecto de extractos sobre los factores de colonización de *H. pylori*.

Se ha analizado el efecto de los extractos de *Parthenium hysterophorus* sobre los factores de colonización de *H. pylori*. Esta especie es una hierba mexicana que se conoce con diversos nombres, entre ellos “chuchuiate” y su raíz se emplea como remedio para tratar la gastritis. Por esta razón se analizó su efecto separando la raíz y la parte aérea de la planta.

Se obtuvieron extractos de la planta bajo una amplia gama de polaridad y se midió, en primer lugar, su efecto directo en el crecimiento de *H. pylori in vitro*. Se encontró que los extractos no polares tuvieron un mayor efecto inhibitorio sobre la bacteria (Tabla II).

Posteriormente se evaluó su efecto sobre la actividad de la ureasa mediante la cuantificación colorimétrica del amonio producido a través de la reacción de Berthelot y su efecto sobre la adherencia de *H. pylori* a células de adenocarcinoma gástrico (AGS) [31]. En éste método se marcan a las bacterias con el fluoróforo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y posteriormente se incuban con las células AGS para determinar el porcentaje de adherencia a las mismas.

Los resultados obtenidos (Tabla II) demostraron que, en general, los extractos de la planta logran inhibir en promedio un máximo del 40% de la actividad de la ureasa de *H. pylori*. En cuanto a la actividad anti-adherente, los extractos logran inhibir parcialmente la interacción de *H. pylori* con las células. Sin embargo, sobresalen los extractos de diclorometano-metanol de raíz y de parte aérea (DM-MetR y DM-MetPA) que tienen un efecto concentración dependiente, obteniéndose el 50% de la inhibición con 0.5 mg/ml de DM-MetR y 0.25 mg/ml de DM-MetPA. Logrando un máximo de inhibición de la adherencia del 70% a 1 mg/ml. Con estos resultados alentadores, se realizó un fraccionamiento primario del extracto DM-MetPA por partición líquido-líquido con metanol-agua 8:2 y hexano. Las fracciones resultantes incrementaron el efecto anti-adherente hasta en un 90% (Fig. 4) y con solo 0.025 mg/ml se inhibió el 50% de la adherencia. Esta actividad antiadherente es muy importante considerando que la adherencia de la bacteria esta mediada por múltiples adhesinas. Actualmente se está trabajando para tratar de identificar los compuestos responsables de la actividad.

Tabla II. Efecto de los extractos de *P. hysterophorus* sobre mecanismos de colonización de *H. pylori*.

EXTRACTO	RAÍZ			PARTE AÉREA		
	Anti- <i>H. pylori</i>	Anti-ureasa	Anti-adherencia	Anti- <i>H. pylori</i>	Anti-ureasa	Anti-adherencia
	CMI (µg/ml)	(µg/ml=% I)	(µg/ml=%I)	CMI (µg/ml)	(µg/ml=% I)	(µg/ml=%I)
Hex	31.25	125=37.5%	1000=49.9%	62.5	250=47.5%	1000=41%
DM	31.25	500=73.8%	1000=28.6%	31.25	125=38.3%	1000=24.1%
DM-Met	125	500=43.5%	1000=68.0%	62.5	62.5=49.3%	1000=73.1%
Met	125	500=40.1%	1000=53.8%	125	125=42%	1000=41%
Acuoso	>250	62.5=19.1%	1000=8.9%	>250	250=32.3%	1000=33.3%

Hex: hexánico, DM: diclorometánico, DM-Met: diclorometánico-metanólico (1:1), Met: metanólico. %I= %Inhibición. En cuadros sombreados se presentan los resultados sobresalientes.

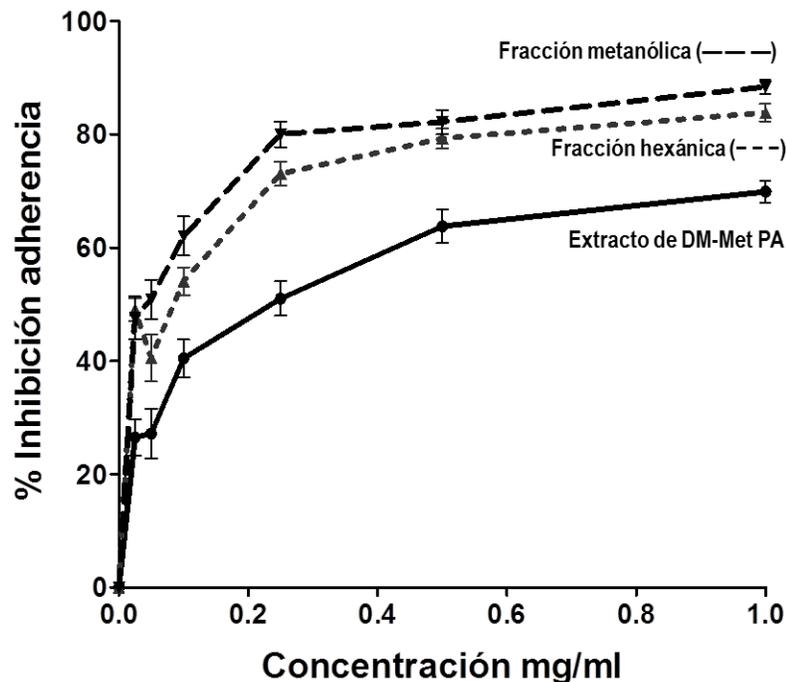


Figura. 4. Actividad anti-adherente del extracto de DM-Met PA de *P. hysterophorus* y sus fracciones.

Como puede apreciarse, los resultados de nuestras investigaciones hasta el momento, nos conducen por dos caminos. Por un lado, el estudio del efecto de los extractos polifarmacológicos y de los compuestos aislados sobre la resolución de las patologías producidas por *H. pylori* en modelos animales; y por otro, el estudio *in vitro* del mecanismo de acción de los mismos, sobre la bacteria.

En conclusión, las plantas medicinales resultan una fuente de recursos a utilizarse en las terapias asociadas con las enfermedades producidas por *H. pylori*.

Agradecimientos. Parte de las investigaciones se realizaron gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN216414.

Referencias

1. Warren, J.R., Marshall, B. (1983) *Lancet*. **321**, 1273-1275
2. Goodwin, C.S., Armostrong, J.A., Chilvers, T., et. al. (1989) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **4**, 397-405
3. Atherton, J.C. (2006) *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **1**, 63-96
4. Torres, J., López, L., Muñoz, O. (2005). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 1874-1877
5. Tomb, J., White, O., Kerlavage, A. R., et. al. (1997) *Nature*. **388**, 539-547
6. Wen, Y., Marcus, E.A., Matrubutham, U., et. al. (2003) *Infect. Immun.* **71**, 5921-5939
7. Testerman, T. L., McGee, D., J., Mobley, H. L. T. *Adherence and Colonization en Mobley, H., L., T., Mendz, G., L., Hazell, S., L., (2001) Helicobacter pylori. Physiology and genetics, ASM press, Washington DC.*
8. Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., et. al., (1998). *Science*. **279**, 373-377
9. Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., et. al. (2002) *Science*. **297**, 573-578
10. Sachs, G., Weeks, D.L., Wen, Y., et. al. (2005) *Physiology*. **20**, 429-438
11. Isomoto H., Moss J., Hirayama T. (2010) *Tohoku J. Exp. Med.* **22**, 3-14
12. Tegtmeyer, N., Wessler, S., Backert, S. (2011) *FEBS J.* **278**, 1190-1202
13. Monteiro, M.A., Chan, K.H., Rasko, D.A., et. al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11533-11543
14. Algood, H.M., Cover, T.L. (2006) *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 597-613
15. Salama, N.R., Hartung ML., Müller A. (2013) *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 385-399
16. Allen, L.A., Schlesinger, L.S., Kang, B. (2000). *J. Exp. Med.* **191**, 115-128
17. IARC (International Agency for Research on Cancer). (1994). Live flukes and *Helicobacter pylori*. IARC. Working group on the evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum.* **61**, 1-241

18. Kusters, J.G., van-Vliet, A.H., Kuipers, E.J. (2006) *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 449-490
19. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., et. al. (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0 Cancer Incidence and Mortality Worldwide. International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr>, acceso 015/01/2014
20. Blaser, M.J. (2008). *Can. Prev. Res.* **1**, 308-311
21. Vakil, N., Megraud, F. (2007) *Gastroenterology.* **133**, 985-1001
22. De Francesco, V., Ierardi, E., Hassan, C., Zullo, A. (2012) *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **6**, 68-73
23. Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., et. al. (2009) *J. Ethnopharmacol.* **122**, 402-405
24. Argueta, V., Cano, J., Rodarte, M., (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Vol. I, Instituto Nacional Indigenista, México.
25. Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., et. al. (2007) *J. Ethnopharmacol.* **114**, 72-77
26. Cortés, A. (2012) Estudio del efecto anti-*Helicobacter pylori* del extracto acuoso de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
27. Borja, E. (2013) Compuestos anti-*Helicobacter pylori* y gastroprotectores de la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM
28. Escobedo-Hinojosa, W.I., (2013) Estudio del potencial anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotector y antiinflamatorio de *Cyrtocarpa procera*. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, UNAM, México, D. F.
29. Escobedo-Hinojosa, W.I, Díaz del Carpio, J., Palacios-Espinosa, J.F., Romero, I. (2012) *J. Ethnopharmacol.* **143**, 363-371
30. Hersch-Martinez, P. (1995). *Econ. Bot.* **49**, 197-206
31. Beil, W., Kilian, P. (2007) *Phytomedicine* **14**, 5-8

Semblanza de la Dra. Irma Romero Álvarez



Bióloga de la Facultad de Ciencias, cursó la Maestría en Bioquímica en la Facultad de Química y el Doctorado en Investigación Biomédica Básica en el Instituto de Fisiología Celular, todo ello en la UNAM. Realizó una Estancia Posdoctoral en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid, España. A su regreso a México, trabajó como Investigador Asociado en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y posteriormente se incorporó en la Facultad de Medicina donde actualmente es Profesor Titular B de TC en el Departamento de Bioquímica.

La línea de investigación que actualmente desarrolla es el estudio del potencial anti-*Helicobacter pylori* de plantas medicinales mexicanas con el fin de identificar compuestos o extractos bioactivos (con actividad antibiótica y/o inhibidores de los factores de colonización) y estudiar su posible actividad gastroprotectora y antiinflamatoria, de manera que los conocimientos generados puedan utilizarse en el desarrollo de una terapia integral para el control de las enfermedades producidas por *H. pylori*.

Tiene más de 30 publicaciones científicas en revistas internacionales y nacionales con arbitraje, 6 capítulos en libros y una solicitud de Patente ante el IMPI. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores y ha recibido otras distinciones como la Medalla Gabino Barreda, por sus estudios de Doctorado, el Premio Anual Marcos y Celia Maus a la mejor Tesis de Doctorado y el Premio Universitario, "Gral. y Lic. Bernardo López García" a la Investigación de Excelencia, otorgado por la Universidad Autónoma de Tamaulipas. Es revisora de artículos de investigación enviados a diferentes revistas de corte internacional.

Ha sido profesora a nivel licenciatura y posgrado de las materias de Biología Celular, Bioquímica y Biología Molecular, Bioquímica Avanzada, Fotosíntesis, Bioenergética y Biomembranas. Y ha dirigido 15 tesis de licenciatura, 1 de maestría y 4 de doctorado.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 103-126, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

INTERACCIONES ENTRE LIGANDOS Y LAS PROTEÍNAS: FUNDAMENTOS, DETECCIÓN Y FUTURO DEL REDISEÑO DE INTERACCIONES

ENGINEERING OF THE INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS AND THEIR LIGANDS.

Alejandro Sosa-Peinado.

Departamento de Bioquímica, Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas. Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F. 04510, México.

Resumen

Las interacciones específicas entre las proteínas y sus ligandos determinan las bases moleculares de su especificidad. En este trabajo describiremos las interacciones no covalentes de las proteínas, sus contribuciones entrópicas, entálpicas, los modelos de interacción y algunas técnicas para determinar la energética de sus interacciones. Este conocimiento, tiene profundas consecuencias en los diseños de blancos farmacológicos, lo que implica entender y modificar las interacciones moleculares. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de información estructural de proteínas, aún es muy difícil generar racionalmente inhibidores específicos o nuevas funciones en las proteínas. Uno de

los problemas inherentes al entendimiento de las interacciones moleculares es su complejidad dinámica, para ello las técnicas de resonancia magnética nuclear y de dinámica molecular apuntan a la importancia de los movimientos y de las compensaciones entre la entropía y a entalpia, para explicar cómo se comunican entre sí las regiones de una proteína y regulan la energética de unión de las proteínas.

Palabras clave: Estructura de proteínas, dinámica conformacional, diseño de proteínas, interacciones proteína ligando.

Abstract.

The specific interactions between proteins with their ligands determine the molecular basis of their specificity. In this work, will be described the non-covalent interactions of proteins, their entropic and enthalpic contributions, the interaction models and techniques to study the energetic of protein interactions. This knowledge is crucial to design pharmacological targets and designs for molecular interactions. However, in spite of the huge amount of structural information, is still difficult to conceive a rational design for new specific drugs or new functions for proteins. One of the most common problems is to understand the molecular interactions due to dynamic nature of the problem. In this sense the techniques of nuclear magnetic resonance and molecular dynamics point out the importance of the protein's movements and the compensation between the enthalpy and the entropy, which may explain the way how different regions of protein communicate information and regulate the energetic of their interactions.

Keywords: protein structure, conformational dynamics, protein design, protein ligand interactions.

Introducción

Entender los procesos celulares y su regulación es fundamental en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, farmacológicas o del área de la salud. Por ejemplo, algunos tipos de células cancerosas dependen del metabolismo glucolítico. Por esta razón, las enzimas de esta vía, son blancos en diseños farmacológicos contra estos padecimientos. Avanzar en estas aplicaciones, depende de comprender las bases moleculares de las interacciones entre las proteínas y su ligandos [1].

A pesar de la numerosa información estructural y funcional de las proteínas, proveniente de estudios bioquímicos y biofísicos aún es muy difícil predecir la especificidad o la afinidad de las proteínas a sus ligandos a partir de la información estructural exclusivamente. Unos de los problemas es que tratamos de analizar a las proteínas desde una visión estática. Para ilustrar esta idea, es cómo si tratáramos de explicar a partir de la foto final de una carrera de caballos ¿Por qué gano? Lo mismo nos ocurre con las estructuras de proteínas, en muchas ocasiones desconocemos los eventos que llevaron a este estado final, a pesar de contar con la imagen estructural final de la proteína con su ligando.

Sin embargo, la conjunción de diferentes disciplinas, tanto experimentales, como teóricas, ha permitido avances notables en los diseños de proteínas. Estos estudios parten de métodos computacionales que permiten búsquedas energéticas y posteriormente se realiza experimentación, por ejemplo, se utiliza las técnicas de evolución dirigida para mejorar los diseños. En este sentido el programa Rosetta ha predicho acertadamente estructuras a partir de la secuencia primaria [2,3]. Con este enfoque se han diseñada un par de enzimas (aun con baja actividad) y también se han planteado nuevas maneras de diseñar inhibidores o sitios nuevos de unión a proteínas [4]. En este contexto recientemente se han generado un consenso acerca de la importancia del papel dinámico y de la flexibilidad de las proteínas (5) para entender estos procesos. En parte, esto ha sido promovido gracias al desarrollo de técnicas dinámicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) [6] y la dinámica molecular (DM) [1]).

Las proteínas gobiernan la gran mayoría de los procesos celulares, por ejemplo, la catálisis enzimática permite la vida en las escalas de tiempo que hoy conocemos; la expresión o represión de genes está modulada por las interacciones específicas de proteínas que se unen al ADN; los procesos de los ciclos celulares; los mecanismos de comunicación mediados por segundo mensajeros, las interacciones específicas con proteínas receptoras, de entre las diversas funciones de las proteínas. Por ello las investigaciones en muchas áreas químico-biológicas requieren del entendimiento de las bases moleculares de estas interacciones [7].

En este trabajo describiremos la participación de una serie de fuerzas no covalentes que contribuyen a la unión de ligandos, para explicar algunos de los elementos que modulan la afinidad de una proteína por sus ligando, ya sea través de efectos directos o propagados (alostéricos), pasando por la descripción energética de la interacción. De ahí iremos a los modelos macromoleculares de las interacciones. También describiremos algunas de las técnicas que se utilizan

para medir diferentes parámetros de las interacciones entre las proteínas y las perspectivas de diseño de interacciones de proteínas a futuro.

La correlación entre la constante de unión y la energía libre de unión.

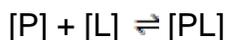
Las proteínas son polímeros de aminoácidos (presentan secuencias específicas) que adquieren una estructura tridimensional específica para llevar a cabo sus funciones. Esta estructura se le denomina estructura nativa. Para la estabilidad de esta estructura, se requieren fuerzas covalentes que unen a los aminoácidos a través de sus enlaces peptídicos y forman el esqueleto hidrocarbonado. Además se requiere de una serie de interacciones no covalentes, que van desde solvatación, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas entre otras para la adquisición de la llamada estructura nativa [8].

Estas son las mismas fuerzas que van a permitir las interacciones específicas para estabilizar o modular las interacciones proteínas-ligando. Estos tipos de interacciones los describiremos en el siguiente apartado. Ahora vamos a hablar de cómo se cuantifica la fuerza de interacción entre las proteínas y sus ligandos a través de la constante de unión o de disociación. Esta constante nos habla de la fuerza de unión entre el complejo proteína-ligando, la forma libre de la proteína y sus ligandos al equilibrio. La determinación de la constante de unión requiere de condiciones de equilibrio termodinámico. Además se requiere de condiciones de reversibilidad del proceso, la proteína y el ligando no deberán presentar ninguna modificación que modifique a la proteína o la mantenga fuera de la solución, solo existirán las formas libres y en complejo. Además la determinación de la K_d será proporcional al número de interacciones.

La constante de disociación está definida por la relación de concentración entre la proteína libre (P), el ligando libre y el complejo proteína-ligando (PL) a partir de la siguiente reacción.



Entonces, si determinamos las concentraciones de cada uno de los componentes de la ecuación



Podemos calcular la constante de disociación, como la proporción entre productos y reactantes (visto desde el sentido de disociación). Esta constante

relaciona se con la fuerza de la interacción, en este caso, mientras el valor sea menor la afinidad será mayor.

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

La energía libre asociada a esta interacción se denomina energía libre de Gibbs, que se calcula a partir de la K_d , de acuerdo con la siguiente relación:

$$\Delta G_d = -RT \ln K_d$$

En donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura.

La energía de interacción la podemos dividir en sus componentes entálpicos y entrópicos de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

La contribución entálpicas corresponden a las interacciones directas entre el ligando y la proteína, sino también a las interacciones que estabilizan desde fuera del sitio de unión. Este tipo fuerzas son las interacciones electrostáticas, los puentes de hidrogeno, las interacciones hidrofóbicas, las fuerzas de Van der Waals, entre otras.

En cambio la contribución entrópica, proviene de los cambios de los grados de libertad de los ligandos y de las proteínas, por ejemplo, la solvatación o desolvatación de moléculas de H_2O durante la interacción, o bien cambios en la flexibilidad local o global de la proteína. Dicho de otra manera las componentes entrópicos se dan por los cambios en la dinámica intrínseca de la proteína durante la interacción Esta información ha sido muy difícil de medir, sin embargo gracias a la instrumentación de resonancia magnética nuclear y estudios de dinámica molecular entre otros métodos, hoy en día se está estudia con más claridad el papel de las interacciones entrópicas de las proteínas.

Si bien por simplicidad vemos las interacciones entre una proteína y su ligando cómo la consecuencia de la interacción entre dos cuerpos rígidos (originado por el concepto de llave cerradura de Emil Fisher, hoy en día, la idea general es visualizar a las proteínas cómo un ensamble de confórmeros proteicos que oscilan alrededor de una estructura (ligando también presenta flexibilidad). Por lo qué, las interacciones no solo dependen de los contactos directas entre la proteínas y su ligando, sino además dependen de las redes de interacciones no covalentes presentes a partir de puentes e hidrogeno, electrostáticas a largo de la proteínas [8].

INTERACCIONES ENTÁLPICAS

Interacciones de cargas o dipolos

Las interacciones electrostáticas se deben a la presencia de cargas reales o parciales y a su interacción cuando cargas de signo opuesto se encuentran vecinas, sus valores energéticos varían desde -1 a -80 kcal/mol. Un ejemplo de una interacción de carga-carga, serían las interacciones entre grupos carboxilo, (con carga negativa) de la cadena lateral de los amino ácidos glutámico y del apartico, con los grupos amino o imino (con cargas positivas) provenientes de la lisina, arginina o histidina. También existen interacciones dipolo-carga, en donde las parte polares (la distribución desigual de electrones genera cargas parciales) y las cargas reales indicadas anteriormente. O bien se puede dar solo por interacciones polares. Por ejemplo, el enlace peptídico presente en las proteínas (que es planar), genera cargas parciales en la región del carbonilo, en un plano y una carga parcial positiva en la región del grupo amino en la otra cara del plano. Esto genera un dipolo específico, no solo al nivel del enlace pepitico, sino también en la estructura secundaria conocida como hélice-alfa (Figura 1).

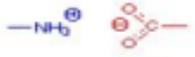
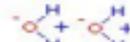
Tipo de interacción	Modelo	Descripción
Carga-carga		 amino-carboxilo
Carga-dipolo		 amino agua
Dipolo-dipolo		 entre aguas
Carga-dipolo inducido		 carga-dipolo de aromáticos

Figura 1. Interacciones no covalentes en proteínas.

Puentes de hidrogeno

Los puentes de hidrogeno, se originan por el dipolo en un hidrógeno covalentemente unido a un átomo electronegativo conocido como donador y otro átomo electronegativo conocido como aceptor, normalmente este átomo es un carbono o un nitrógeno. El puente de hidrógeno puede ser considerada como una interacción electrostática tipo dipolo-dipolo. Sin embargo se le da un tratamiento

especial, debido a su abundancia y su contribución en la estabilización de las estructuras secundarias conocidas como: hélice alfa y hojas plegadas.

La energía del puente de hidrogeno es pequeña con respecto a cualquier unión covalente sin embargo oscilan entre -3 a -7 kcal/mol. A pesar de que esta interacción presenta un carácter débil, su valor energético llega a alcanzar casi un décimo de la energía de un enlace covalente, por lo que, es la fuerza no covalente más fuerte. Debido a la presencia de un gran número de donadores y aceptores de puentes de hidrogeno en la estructura de las proteínas, estas interacciones son fundamentales en su estabilidad. Además debido a su carácter débil, le permite generar diferentes reacomodos durante las interacciones de la proteínas con sus ligandos, o cuando se dan cambios en la conformación local o global de las proteínas.

En adición, los puentes de hidrógenos al formarse y desaparecer debido a que sus energías oscilan alrededor de las fluctuaciones térmicas, los puentes de hidrógeno se comportan como redes de conectividad que están fluctuando alrededor de la estructura de la proteína. Por lo que tenemos promedios en contactos de puentes de hidrógeno función del tiempo, por lo que es difícil de rastrear los cambios en estas redes a lo largo de las proteínas.

Interacciones de Van der Waals.

De acuerdo con la definición de la IUPAC [9], las fuerzas de Van der Waals, son las fuerzas de atracción o repulsión entre moléculas o regiones de la misma molécula, diferentes de aquellas de la formación de enlaces covalentes o de las interacciones electrostáticas o entre iones o grupos iónicos. Este tipo de interacciones incluye Interacciones dipolo-dipolo, dipolo- dipolo inducido y las fuerzas de London que incluyen las interacciones instantáneas de dipolos inducidos. Las fuerzas de atracción generalmente provienen de la formación de los dipolos debido a la distribución no equitativa de densidades electrónicas entre átomos que nos presentan cargas reales y enlaces covalentes. Estas interacciones son repulsivas cuando la distancia entre los átomos es pequeña, y no se presentan dipolos y por lo tanto las nubes electrónicas cercanas entre átomos se superponen y se da la repulsión.

Las interacciones de Van der Waals son muy débiles (0.5 a 1 kcal/mol), en particular cuando se comparan con los enlaces covalente, o inclusive las electrostáticas, sin embargo el número de estas interacciones es substancial y pueden ser una parte apreciable de la energía de interacción de una proteína. Ya

que las distancias que forman las interacciones de Van der Waals dependen de las características particulares de las nubes electrónicas de cada tipo de átomo, esta distancia se denomina radio de Van der Waals, que determina la superficie de contacto entre los átomos de una molécula, como se observa en la figura 2.

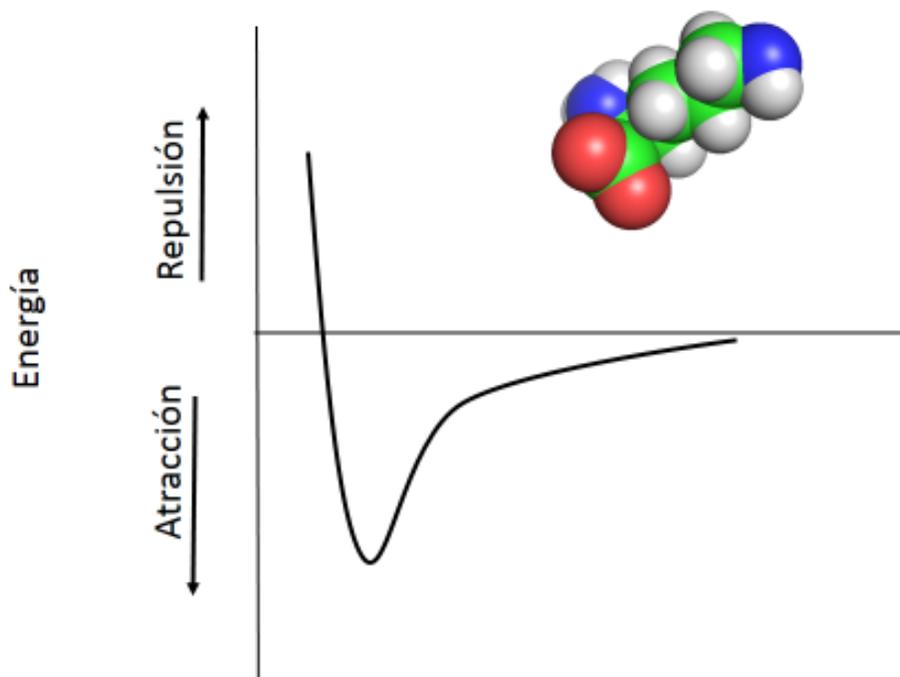


Figura 2. Distancia óptima de las interacciones de Van der Waals determina la superficie de las moléculas. La distancia óptima está representada en el punto máximo de atracción.

Interacciones hidrofóbicas

Las interacciones hidrofóbicas se dan entre las regiones apolares de las proteínas y de sus los ligando. Estas regiones apolares tienden a ser repelidos del agua o de cualquier grupo polar, es decir los grupos apolares, tiendes a acercarse por exclusión del medio acuoso en el que se encentran las proteínas. Esto se debe a que las moléculas de agua prefieren interactuar con moléculas de agua o moléculas polares y más bien tienden a excluir aquellas moléculas que no son de agua. Por eso las regiones hidrofóbicas son excluidas del solvente acuoso y tienden a interactuar entre ellas [8,9].

Las regiones apolares de las proteínas serían los residuos hidrocarbonados de los aminoácidos no polares y las cadenas laterales de los residuos de

triptófano, fenilalanina y tirosina, y de hecho podemos generar una escala de hidrofobicidad de los aminoácidos por su partición o transferencia de medios polares a medios no polares, en esta escala de hidrofobicidad el aminoácido más hidrofóbico es el triptófano. Normalmente las interacciones no polares tienden a estar en el centro de una proteína, excluidas del solvente, aunque también en las proteínas membranales, o las proteínas asociadas a la superficie de las membranas, son fundamentales estas interacciones las que permiten su estabilidad y su función, sus valores energéticos varían de 0.5 a 3 kcal/mol.

Interacciones aromáticas catión- π .

Interacción catión- π , este tipo de interacción ha sido denominada como el cuarto tipo de interacción no covalente entre proteínas, se da este tipo de enlace por la interacción electrostática entre un catión y la densidad de carga negativa asociado a los orbitales π de una molécula vecina. Por ejemplo, los orbitales π se encuentran en anillos aromáticos de residuos como tirosina y triptófano.

La energía de esta interacción es comparable a la de un puente de hidrógeno. Además esta interacción está presente un sin número de interfaces proteicas, inclusive estabiliza la estructura terciaria de las proteínas. También se encuentra en el sitio de unión en numerosas proteínas neuroreceptoras, pues estas interacciones son importantes durante el reconocimiento de neurotransmisores, en proteínas receptoras acopladas a proteínas G. También se han encontrado en el reconocimiento a substratos de enzimas, por ejemplo en estados de transición en fosfolipasa C, en proteasas de serina, ADN glicosilasa. O bien en el sitio de unión de proteínas periplásmicas (Figura 3).

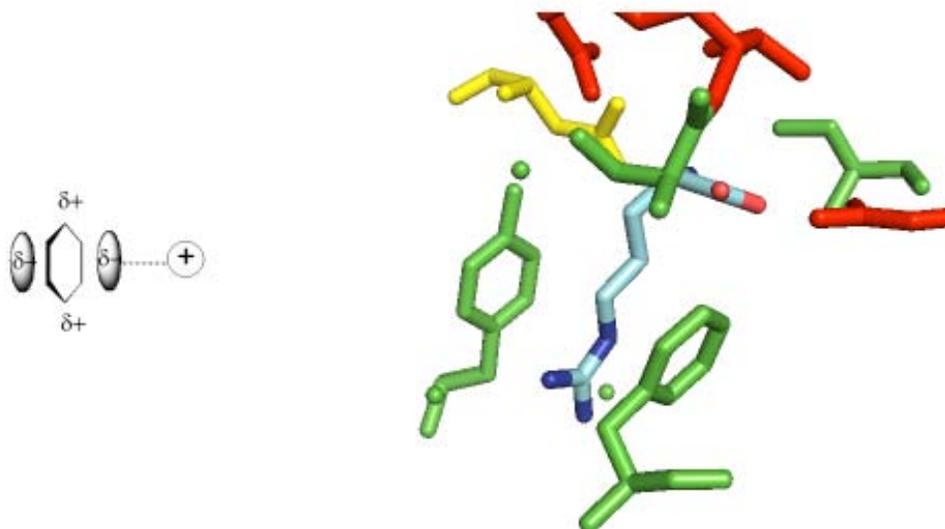


Figura 3. El sitio de unión de la proteína periplásmica de unión a aminoácidos positivos, presenta una interacción catión- π , que estabiliza la unión con ligandos con carga positiva.

Las contribuciones entrópicas y su importancia en procesos de compensación.

Si bien, conocemos la estructura molecular de las proteínas y sus interacciones a través de diversas técnicas, sería simple sumar la energía de cada una estas contribuciones para obtener el ΔG total de interacción de acuerdo con la ecuación de la energía de la energía libre de Gibbs (que nos relaciona los componentes entrópicos y entálpicos). Sin embargo, no es tan fácil cuantificar la magnitud de las contribuciones entrópicas. Porque están asociadas a los cambios en la dinámica intrínseca de las proteínas, es decir a los cambios en flexibilidad, a los cambios en el reordenamiento de moléculas de agua, ya sean durante solvatación o la re-solvatación de moléculas de H_2O hacia proteína. O bien al reacomodo de las redes de las interacciones dinámicas de puentes de hidrógenos o de cargas, lo que resulta muy difícil de evaluar experimentalmente, pues son la suma de las contribuciones favorables y desfavorables [10].

Por ejemplo, si se favorecen las interacciones entálpicas entre una proteína y su ligando, en cierto modo se aumenta el número de interacciones no covalentes, lo que a su vez genera una mayor conectividad, y a su vez aumenta la rigidez local de la proteína en el sitio de unión. La consecuencia de cambio de rigidez, es la modificación de la entropía de la proteína. Este efecto se le llama

compensación entre la entropía y la entalpía [11]. La consecuencia, es que en muchos casos los cambios en el ΔH de interacción, está asociado a cambios opuestos en el $T \Delta S$ de la interacción. Y esto es requerido durante la optimización de la unión de los ligandos a las proteínas. Por ejemplo en el siguiente caso el ΔG de unión de un ligando a una proteína es de -10 kcal/mol, si se realiza un diseño y se mejora un poco el ΔG de unión a -15 Kcal, la combinación de fuerzas entrópicas y entálpicas, pueden ser mucho mayores que el simple la suma del ΔG (Figura 4).

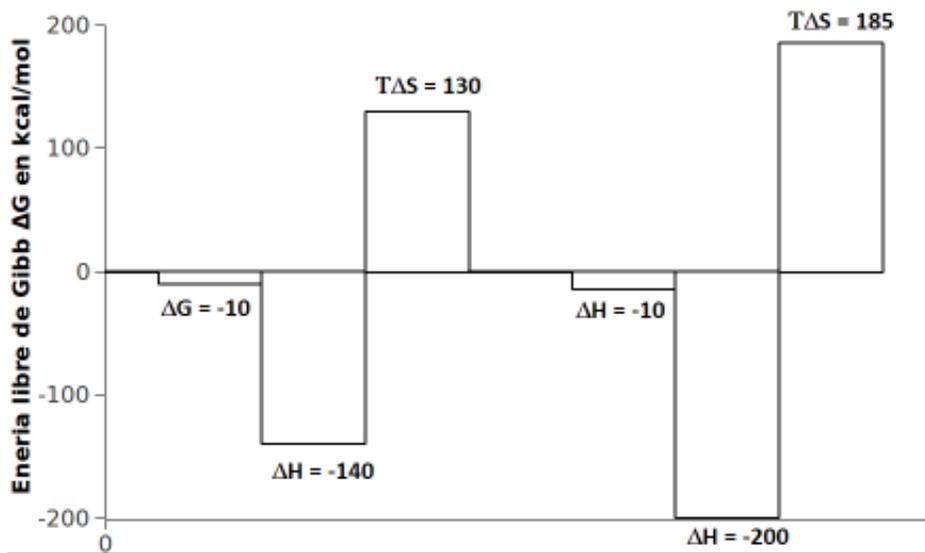


Figura 4. Cambio en ΔH y $T\Delta S$. En este caso se trata de ilustrar, que a pesar de cambios pequeños ΔG de unión de -10 a -15 kcal/mol, los cambios en entalpía y entropía son mayores de lo que se aprecia.

Además, el efecto de la compensación entálpico-entrópico puede ser cooperativo, es decir en ocasiones la interacción de un ligando a una proteína, estabiliza una conformación dentro del ensamblaje de conformeros proteicos, y esto puede favorecer la unión de los subsecuentes ligandos [12]. Por lo que la suma de los componentes individuales de la interacción (que determinan la energía libre de unión) no necesariamente será la suma aritmética de los componentes individuales. En ese sentido las técnicas dinámicas tanto experimentales (RMN) como teóricas (DM), han permitido reevaluar la importancia de estas compensaciones en la energía final de interacción [13,14].

Mecanismos generales de la interacción; El concepto de la llave que embona en la cerradura

La historia de la bioquímica está asociada de una u otra manera a las reacciones catalizadas por enzimas y por supuesto al origen de la especificidad por sus substratos. Ya desde 1894 Emil Fisher planteó el concepto de llave cerradura para la unión de substratos a las enzimas. Esta idea es simple, la proteína y los ligandos presentan una estereoquímica o arreglo espacial preciso, por lo que, las interacciones responden y se complementan como si fuera esa llave que se ajusta perfectamente en la cerradura a nivel molecular.

En parte esta visión fue reforzada desde las primeras estructuras tridimensionales de proteínas, a partir de la difracción de rayos X de cristales proteicos. Estas estructuras fueron la mioglobina y la hemoglobina por Kendrew y Perutz respectivamente [15]. Posteriormente fue la estructura de la primera enzima, la lisozima por David Phillips y colaboradores. Dado que esta técnica muestra las fotografías instantáneas, se asociaron a las interacciones como cuerpos rígidos en donde las proteínas y sus ligandos simplemente eran complementarios y no presentaban cambio en movilidad o reorientación de los grupos funcionales responsable de la interacción.

El ajuste inducido

Fue en 1958, que Daniel Koshland en 1966, propuso el modelo de ajuste inducido para explicar las bases moleculares de ciertos procesos catalíticos. En este modelo, los ligandos al unirse a la proteína son distorsionados, por las fuerzas de interacción y por los movimientos locales del sitio de unión, de tal manera que el ligando forma el estado de transición. En este estado disminuye la energía libre del ligando, se parece más al producto, y así procede la reacción hacia la formación de producto. Este proceso requiere de una reorientación específica entre el substrato y del sitio de unión, la interface de esta interacción sufre cambios locales de conformación, por ejemplo, asas que se mueven, reorientación de grupos, que llevan a la reorientación de la estructura del substrato y de la reorientación de los grupos catalíticos del sitios de unión, lo que induce la formación de producto.

Parte de esta visión está asociada con el mecanismo molecular de la hexocinasa por ejemplo. Esta enzima, tiene una forma bilobulada y cambia de conformación cuando une a su ligando (carbohidrato) hacia una forma cerrada. Es

decir el ajuste inducido producido por la unión del sustrato permite cambiar hacia un estado cerrado donde la catálisis es más favorable [16].

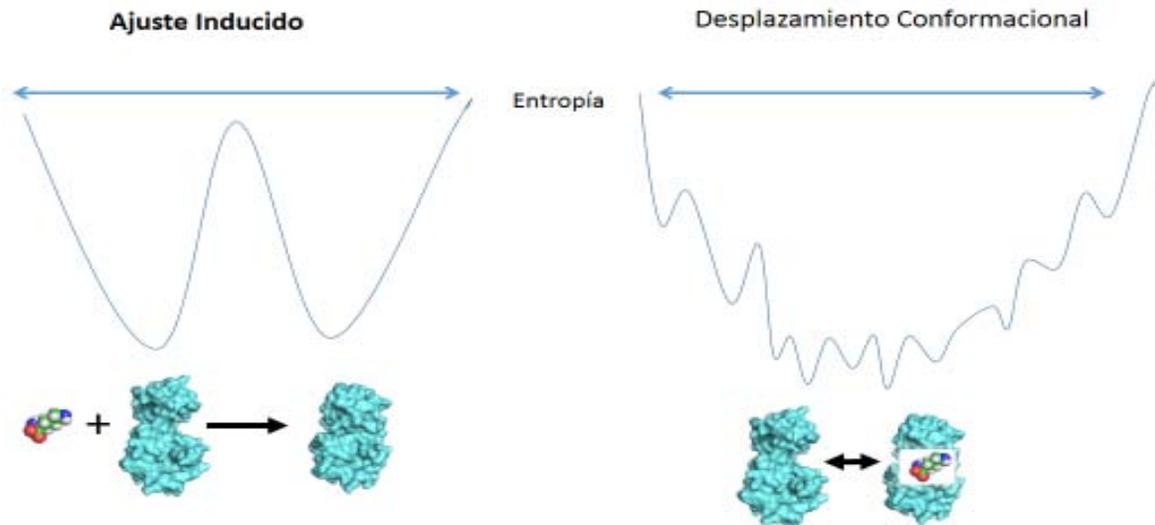


Figura 5. Ajuste inducido versus desplazamiento conformacional.

El desplazamiento conformacional

El desplazamiento conformacional proviene de la idea de que los valores de estabilidad energética de una proteína es baja (El ΔG de estabilidad oscila entre -10 a -15 kcal/mol). Es decir existen fuerzas que estabilizan y desestabilizan al mismo tiempo a una proteína para mantenerla marginalmente estable [14]. Así que cualquier interacción o formación de contactos, es compensado en la desaparición de contactos en otra región. La consecuencia de esta interacción produce modificaciones en las redes dinámicas de interacciones internas de la proteína o sus interacciones con el solvente.

Otra consecuencia de una energía de estabilidad baja es que la estructura de una proteína no es un conformero único, más bien es un conjunto en equilibrio de conformaciones, que se ha denominado ensamble molecular (17Nussinov y col 2014). De tal suerte que la proteínas visitan diferentes estados conformacionales en solución y más bien la presencia del ligando estabiliza la formación del complejo entre la proteína y el ligando. En vez del concepto de ajuste inducido, en donde se requiere la presencia del ligando, para que la proteína adquiriera su nueva conformación [7, 17].

En parte esta teoría tiene su sustento en la flexibilidad de las proteínas, observada originalmente a partir de los factores B cristalográficos y posteriormente las estructuras experimentales obtenidas por resonancia magnética nuclear. Esta última técnica muestra que las proteínas son un conjunto de estructuras que oscilan alrededor de un mínimo estructural. De tal suerte que la unión de un ligando induce interacciones pero a la vez desaparecen otras interacciones para mantener la energética global de la proteína [18]. Es decir el ensamble molecular se mueve más bien entre mínimos poblacionales energéticos, que entre estructuras individuales.

Una perspectiva más concertada de los diferentes mecanismos en los mecanismos de unión desde la visión del ensamble molecular.

La visión no estática de la estructura de una proteína, nos dice que el llamado paisaje energético de una proteína, es un conjunto de estructuras que se describen energéticamente como el perfil de un embudo con una superficie rugosa (Fig. 5 y 6.), en la parte superior de la gráfica el embudo es ancho y presenta muchos posibles confórmeros poco estables en energía. Mientras la energía se hace más negativa, se desciende en el embudo y la proteína es más estable para reducir el número de confórmeros finales. Sin embargo coexisten diferentes de estructuras oscilando alrededor de mínimos energéticos. Esta visión a tiene repercusiones en nuestro entendimiento de las interacciones. Por ejemplo si consideramos que una presenta dos estados conformacionales T y R definidos en muchas transiciones alostéricas, no quiere decir, que estén muy distantes en términos energéticos, ambos estados podrían ser visitados en ausencia y en presencia del ligando, más bien el ligando estabilizaría el estado R. Una pieza muy importante es que en este proceso de desplazamiento conformacional, no existe razón para excluir procesos de ajuste inducido (Figura 6).



Figura 6. Desplazamiento conformacional. Las proteínas son un ensamble de conformeros y más bien los ligandos estabilizan los estados conformacionales, además esto no excluye los fenómenos de ajuste inducidos.

Es decir la visión más realista y compleja coexiste y nos evidencia que ambos procesos ocurren al mismo tiempo (Figura 6). Por ejemplo los efectos de desplazamiento conformacional podrían dominar la transición de R a T mientras que el ajuste inducido este dominado por la transición de T a R. Recientemente el grupo de Nussinov en un revisión, va aún más lejos y puntualiza: Existen múltiples estados conformacionales que han sido optimizados por la evolución. La selección conformacional ocurre a los largo de los paso involucrados las vías alostéricas o de comunicación entre regiones de una proteína. Cada uno de los pasos de las vías alostéricas, pueden estar acoplados a fenómenos de ajuste inducido [7,17].

Técnicas experimentales para estudiar las interacciones proteína-ligando

La difracción de rayos X de cristales de proteínas ha sido fundamental en la información estructural de las interacciones de las proteínas, ya que esta técnica permite la resolución a nivel atómico de las estructuras proteicas. A pesar de que estas estructuras son estáticas, se han determinan estructuras de la misma proteína en diferentes condiciones, en ausencia y presencia de substratos, lo que ha permitido reconstruir posibles rutas de interacción o evidenciar estados de

transición durante las interacciones. Además existen los llamados factores B cristalográficos, que son obtenidos a partir del ajuste de las densidades electrónicas a las estructuras, este valor permite determinar que regiones son más flexibles en las proteínas. Es decir, los factores B generaran una idea global de los movimientos dentro de las estructuras de proteína, sin embargo no nos habla de las escalas de tiempo de los movimientos involucrados, para esto requerimos otras técnicas experimentales.

El intercambio hidrogeno-deuterio, a través de técnica de resonancia magnética nuclear o más recientemente por espectrometría de masas han permitido estudiar procesos dinámicos de interacción entre proteínas. Hay regiones que se exponen u ocultan al solvente dependiendo del estado molecular, o de las interacciones de las proteínas. Durante el intercambio hidrogeno-deuterio los hidrógenos se intercambian con deuterios del solvente solo cuando se expongan al solvente y no habrá intercambio mientras estén ocultos al solvente, por lo que en un curso temporal es posible observar los cambios de exposición al solvente, que estén asociados tanto a los confórmeros en equilibrio, o bien cuando la proteína interacciona, inclusive para estudios de adquisición de la estructura nativa en el tiempo, es una técnica que permite monitorear el orden en el que se ensamblan las diferentes regiones de una proteína.

Calorimetría de titulación isotérmica ITC

Esta técnica permite medir el calor absorbido o emitido durante un proceso de unión. Para este proceso, el sistema consiste en dos celdas una de referencia sin proteína y otra con proteína, a ambas celdas se les adiciona un ligando y se mide el calor intercambiado durante un proceso de titulación, al cual se le resta el calor de disolución de la celda de referencia y se ajusta a un modelo teórico termodinámico de la interacción [19]. Este sistema se ha utilizado con mucho éxito para medir el calor intercambiado durante la unión de un ligando a una proteína. La ventaja de esta técnica es que permite no solo medir la constante de disociación a la proteína (K_d), también se determinan los parámetros termodinámicos importantes, que son la energía libre de Gibbs de unión (ΔG), la entalpia (ΔH), y la entropía (ΔS) en un solo experimento. Esta técnica permite medir la constante de unión en un intervalo de mM hasta los límites superiores de nM.

Otra ventaja de esta técnica es la medida del cambio en la capacidad calórica (ΔC_p) asociado a la unión, para esto se requiere hacer el experimento a

varias temperaturas. Debido a que el ΔC_p correlaciona con la determinación del área oculta de la proteína al solvente en el proceso de interacción, o dicho de otra manera correlaciona con los procesos de desolvatación asociados a la interacción de moléculas de agua. La información de la cantidad de área involucrada en procesos de solvatación se combina con la información estructural, para obtener información entrópicas de los procesos de solvatación, que por otras técnicas es muy difícil visualizar.

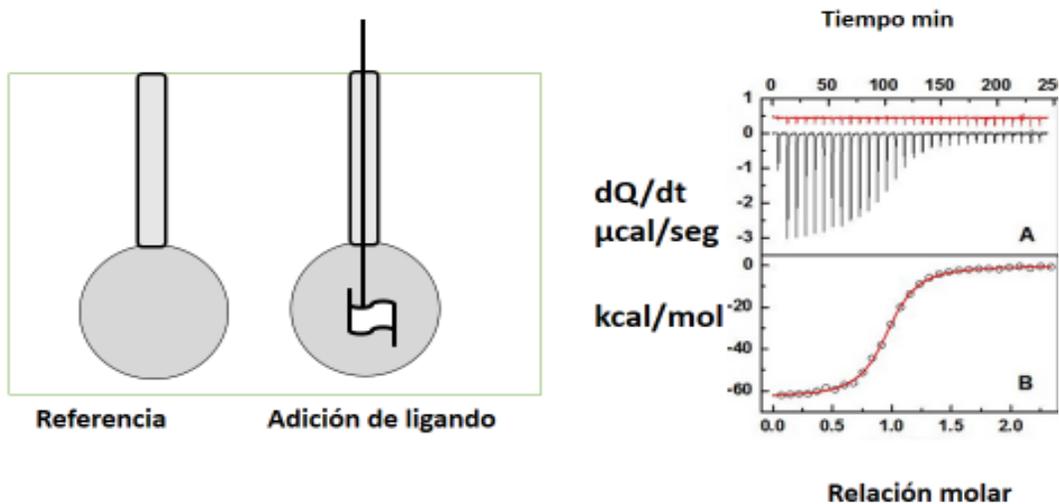


Figura 7. Calorimetría de titulación isotérmica. La diferencia de calor absorbido entre una referencia y una muestra, permite medir el calor absorbido o liberado y se le ajusta a un modelo de unión.

Resonancia de plasmones en superficie

La resonancia de plasmones en superficie es una técnica que detecta los cambios en el índice de refracción cerca de una superficie. Esta superficie de detección es parte de un sistema de flujo continuo, a la cual se le se adhiere una proteína a través de técnicas de inmovilización. A través de un sistema de flujo continuo, es posible hacer circular un ligando en solución sobre la proteína inmovilizada (Figura 8). Cuando se da la interacción entre la proteína y el ligando, el índice de refracción de esta superficie cambia de manera proporcional a la magnitud de la interacción. Esta técnica no solo es muy sensible, sino que además se realiza en tiempo real, de hecho la respuesta es graficada en unidades de respuesta arbitrarias en función del tiempo. A partir un tiempo de respuesta, el

ligando se lava con la adición de solución y por las constantes cinéticas de unión y disociación del ligando vistos como aparición y disminución de las unidades de respuesta en función del tiempo, es posible determinar la constante de disociación, en tiempo real y realizar pruebas masivas dado el sistema de flujo continuo.

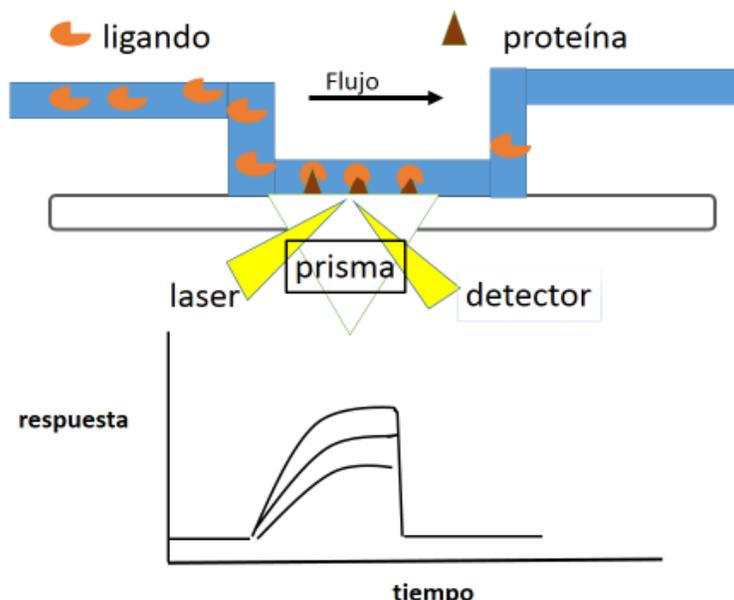


Figura 8. Resonancia de plasmones en superficie. Sobre la superficie se inmovilizan proteínas y por los cambios en los ángulos de difracción del láser se detecta la interacción.

Resonancia magnética nuclear

Esta técnica permite obtener la información estructural de una proteína en solución. La primera conclusión obtenida de una estructura obtenida por RMN es la presencia de un ensamble de conformeros alrededor de un mínimo energético, en vez de una sola estructura (Figura 9), lo que hace sentido con la visión de los ensambles moleculares. Esta técnica se basa en la detección de los spins nucleares de muestras enriquecidas con los isótopos nucleares ^1H , ^{13}C , ^{15}N o ^{19}F . Cuando una muestra de proteínas enriquecida con los isótopos mencionados se aplica a un campo magnético, entonces los núcleos se orientan de acuerdo al campo magnético. A partir de estas condiciones, se aplica energía precisamente en la radiofrecuencia que absorben los, provocando que los núcleos se reorienten y se detectan estos cambios en las señales de resonancia. Lo importante es que esta

orientación va a ocasionar cambios de señales según sea el ambiente inmediatamente cercano (polar, no polar, pH etc), dependiendo de la naturaleza química de los átomos vecinos y de su orientación precisa. Por lo que esta técnica es ideal para reconstruir de manera precisa las conectividades tridimensionales de los átomos y sus vibraciones en función del tiempo. Es decir, también nos brinda información dinámica de los movimientos. La limitante de esta técnica es el tamaño de la proteína a estudiar (no mayor de de 150 k Daltones), el tiempo de análisis requerido para obtener una estructura y los costos de la preparación de esta muestras, pues los isotopos nucleares son caros y se requiere concentraciones cercanas a mili-mol de una proteína. Existen otras revisiones que abordan el refinamiento de las estructuras de proteína a partir de RMN, más bien en este artículo nos enfocaremos en su uso y las implicaciones

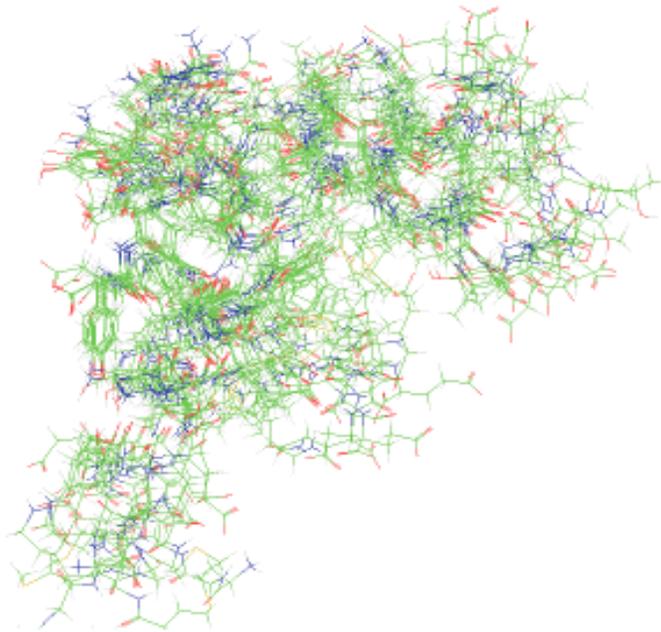


Figura 9. Ensamble de conformeros obtenido en una estructura de proteína resulta por RMN.

Estudios recientes han permitido observar los cambios de movimientos de las proteínas en ausencia y presencia de ligandos, o bien estudiar estos cambios en función de tiempos. Por ejemplo ciertos estudios permiten analizar el papel de las vibraciones locales en la estabilidad de la proteína. También han permitido comparar el efecto sutil de una mutación, el cambio de especificidad de un ligando

en toda la dinámica de movimiento de la proteína, entre otros estudios. Además esta técnica permite medir los cambios de las moléculas de agua unidas a la proteína y un parámetro muy importante, que es la entropía conformacional de algunas proteínas [6,20].

En particular cuando una proteína cambia de conformación al unir un ligando, los cambios asociados a la transición ocurren en una escala lenta de tiempo, del orden de micro a milisegundos. Estas son escalas de tiempo mucho más lentas de que las vibraciones de pico a nano segundos también observadas en las proteínas. El problema que la unión de un ligando a una proteína, afecta de manera desigual los movimientos rápidos (a veces aumenta o disminuyen). Por el otro lado, los cambios en los movimientos lentos de la escala de milisegundos no siempre correlacionan al unirse el ligando. Una manera de analizar la entropía conformacional o los cambios en movimiento ha sido a través de los estudios de relajación de RMN [21]. En estos estudios el movimiento de los átomos es descrito por un parámetro de orden al cuadrado (O^2 , figura 10). Este parámetro está definido por un vector de movimiento que va de 1 en el máximo desorden o movimiento isotrópico (se mueve igual en cualquier dirección) a una condición de rigidez es este movimiento (valor de 0). Esta determinación experimental a través de RMN permite hacer una aproximación de la entropía conformacional, o de los cambios en movimientos, a partir de la medida vibraciones en los átomos de manera cuantitativa. Los cambios rápidos en movimientos están asociados con una mayor entropía configuracional. Y es precisamente esta energía quien contribuye a la unión de ligando a una proteína.

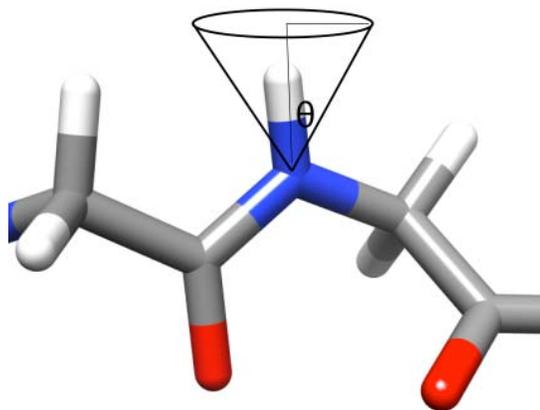


Figura 10. Vector de movimiento O^2 , es utilizado para describir los movimientos a través de la aproximación de Sibari y Szabo, para relacionar el movimiento de los átomos con la entropía conformacional.

Medidas de este parámetro de orden tanto en la proteína calmodulina y la proteína activadora del catabolito (CAP) que se une al ADN, se lograron obtener correlaciones lineales, entre el parámetro de orden O^2 y la afinidad a ligando para diferentes mutantes de ambas proteínas [5]. La conclusión de estos estudios es que tanto los movimientos rápidos que contribuyen a la dinámica conformacional, así como los movimientos lentos que nos hablan de cambios entre estados que nos hablan el desplazamientos conformacional, son importantes para definir las afinidades de la unión a ligandos y tiene que ser tomados en cuenta en rediseños de interacciones.

Técnicas computacionales y perspectivas al problema de la interacción proteína ligando.

Entender la complejidad de las interacciones proteína ligando requiere de la conjunción de métodos bioquímicos y biofísicos cada vez más complejos, que acabamos de revisar. Además, el número de variables presentes es difícil de controlar: las múltiples conformación del ligando durante la interacción; la complejidad del ensamble de conformaros presente en una proteínas; la red de interacciones moleculares (interacciones no covalentes) que cambian durante la interacción; las nuevas interacciones que se crean con el solvente o entre la proteína, para generar importantes contribuciones entrópicos.

En este sentido el proceso deja de ser esa interacción de cuerpo rígido y las compensaciones entre la entalpia y la entropía juegas un papel fundamental. Por tal motivo la perspectiva computacional de simulación molecular permite describir algo del ensamble molecular descrito, así como de los posibles eventos presentes.

Dinámica Molecular

La dinámica molecular utiliza las ecuaciones de mecánica clásica provenientes de los principios planteados en las ecuaciones de movimiento de Newton. Para esto se realiza una evaluación de la energía total del sistema proteico, a través de las ecuaciones que describen la energética de las interacciones covalentes, es decir describe la energética de los enlaces, sus ángulos, torsiones, etc (ecuación 1), además de un componente de interacciones no covalentes (no-unión, ecuación 2).

$$E(R) = \sum_{\text{uniones}} \frac{k_i}{2} (d_i - d_{i,0})^2 + \sum_{\text{angulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) + E_{\text{no-union}} \quad (1)$$

$$E_{\text{no-union}} = \sum_i \sum_j (4\epsilon_{i,j} [(\frac{\sigma_{i,j}}{r_{i,j}})^{12} - (\frac{\sigma_{i,j}}{r_{i,j}})^6]) + \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{r_{i,j}} \quad (2)$$

El componente no covalente tiene que ver con las fuerzas de Van der Waals, electrostáticas, etc (ecuación 2).

Durante la dinámica molecular aplicamos las ecuaciones de movimiento descritas por Newton, de tal suerte que obtenemos una trayectoria de los átomos en movimiento, sin involucrar ruptura o formación de enlaces covalentes. A través de esta técnica, podemos simular la interacción entre un ligando y una proteína. Esta técnica presenta el problema de muestreo, es decir no siempre es posible explorar todas las posibilidades que existen en solución, por esto es muy importante correlacionar esta información con las mediciones experimentales de RMN.

Sin embargo, el poder creciente de cómputo, aunado a los costos más accesibles, ha permitido hacer muestreos cada vez más grandes de esta dinámica conformacional de las proteínas, algunas de milisegundo. Las escalas de tiempo de los estudios dinámicos, cada vez se acercan más a las experimentales, que son parte de las escalas de tiempo donde ocurren parte de estos eventos.

Esta información computacional actualmente es confrontada y enriquecida por los métodos experimentales. En ese sentido una reciente revisión de expertos en el campo [22] puntualiza avances y perspectivas de la dinámica molecular en el estudio de las interacciones proteína-ligando:

-El reconocimiento molecular que permite la interacción de ligandos con proteínas en solución, es un proceso complejo en el ensamblaje de conformaciones de las proteínas receptoras, sus ligandos y sus estados de hidratación

-Estructuras que representan un promedio de estos ensamblajes y la heterogeneidad de estos ensamblajes, pueden ser evidenciados por las búsquedas computacionales, a reserva de ser estudiados o detectados por métodos experimentales.

-La llamada firma termodinámica que guía en proceso de interacción, es decir el papel de los componentes termodinámicos, entropía y entalpía, permite entender más de las bases moleculares que pensar solo en la energía libre de unión.

-Existen muchas interacciones en la proteína, que nos están en el sitio de unión y son fundamentales pues median interacciones con el H₂O (solvente) que son importantes en la estabilidad de ensamble de la proteína.

-Los estados previos a la interacción de las proteínas con sus ligandos son más diversos de lo que veían por otras técnicas, en parte por la gran flexibilidad de las proteínas, así como los cambios en deshidratación o rehidratación del ligando a lo largo de las interacción con la proteína.

-Ha sido fundamental la información dinámica para desarrollar métodos que toman en cuenta los efectos entrópicos o dinámicos, de los solutos, de los solventes, de las interacciones. Así como permitir, metodologías, que correlacionan la información teórica con la experimental.

Conclusión

Para estudiar las interacciones ligando proteína, es requerida una visión multidisciplinaria [23], además de combinar el enfoque teórico y experimental. Particularmente, el problema es dinámico, pues las proteínas son ensambles de conformaciones, el análisis termodinámico de las fluctuaciones y del papel de la entropía conformacional, es fundamental.

Referencias

1. Barratt, E., Bingham, R.J., Warner, D.J., Laughton, C.A., Phillips, S.E. y Homans, S.W. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* 127 (33):11827-11834.
2. Das R, y Baker D. (2008) *Annu. Rev. Biochem.* 77:363-82.
3. Kaufmann K.W, Lemmon G.H, Deluca S.L, Sheehan J.H, y Meiler J. (2010) *Biochem.* 13:2987-2998
4. Tinberg, C. E., Khare S. D., Dou J., Doyle L., y Nelson J. W., Schena A. (2013) *Nature* 501: 212-216.
5. Shiou-Ru Tzeng¹ and Charalampos G y Kalodimos (2011) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21:62–67.
6. Akke M. (2012) *Biochem. Soc. Trans.* 40(2):419-23
7. Nussinov R, y Wolynes PG. (2014) *Phys. Chem.* 16:6321-6322.
8. Gregory A. y Dagmar R. (2003) In *Protein Structure and Function* 1er Ed, NewSciencePress, NY.

9. Nick, M. Jirat, J., y Kosata, B. (1997) IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, (the "Gold Book") 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. NY.
10. Martin S.F, y Clements J.H. (2013) *Annu. Rev. Biochem.* 82:267-93.
11. Chodera J.D, y Mobley D.L. (2013) *Annu. Rev. Biophys.* 42:121-42.
12. Monod J, Wyman J, y Changeux J.P. (1965) *J. Mol. Biol.* 12:88-118.
13. Igumenova T.I, Frederick K.K, y Wand A.J. (2006) *Chem. Rev.* 106:1672-99.
14. Meyer, B., y Peters T. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 864 890.
15. Helen M. y Berman (2008) *Acta Crystallographic Section A.* 64: 88-95.
16. Koshland D.E. Jr, Nemethy, G, y Filmer D. (1966) *Biochem.* 5:365-385.
17. Nussinov R., Ma B., y Tsai C.J. (2014) *Biophys Chem.* 186:22-30.
18. Panagiotis L, Kastiris PL, y Bonvin A.M. (2012) *J. R. Soc. Interface.* 10: 20120835.
19. Perozzo R, Folkers G, y Scapozza L. (2004) *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 24:1-52.
20. Wand A.J, Moorman V.R, y Harpole KW. (2013) *Top. Curr. Chem.* 337:69-94.
21. Wand A.J. (2013) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23:75-81.
22. Baron R, y McCammon JA. (2013) *Annu. Rev. Phys. Chem.* 64:151-75.

Semblanza del Dr. Alejandro Sosa Peinado



El Dr. Alejandro Sosa Peinado realizó la licenciatura en Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM, posteriormente, realizó estudios de maestría y doctorado en el programa de Investigación Biomédica Básica de la UACPyP de la UNAM. Ha realizado diversas estancias postdoctorales en "The Chicago Medical School" y en "The University of Chicago", así como estancia sabática en "The University of Edinburgh", Scotland, UK, además de diversas estancias de investigación en el extranjero. Actualmente es profesor-investigador del Laboratorio de Físicoquímica de Proteínas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Sus investigaciones se enfocan a las interacciones ligando proteína y diseño de proteínas a través de diversas técnicas bioquímicas, que involucran técnicas de dinámicas de estudio de proteínas. En particular estudia los cambios conformacionales asociados a proteínas que cambian de conformación cuando interactúan con sus ligandos.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 127-144, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014).
(<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

PAPEL DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL CRECIMIENTO DE TUMORES CEREBRALES HUMANOS

ROLE OF SEX HORMONES IN THE GROWTH OF HUMAN BRAIN TUMORS

Valeria Hansberg-Pastor, Aliesha González-Arenas, Ignacio Camacho-Arroyo

Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad Núm. 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Coyoacán, 04510, México, D.F., México.

Resumen

Las hormonas sexuales regulan diferentes funciones en las células mediante la interacción con sus receptores intracelulares, los cuales son factores de transcripción activados por ligando. Estos receptores regulan la expresión de genes involucrados en el crecimiento y proliferación de las células, por lo que se han asociado al desarrollo tumoral. Los tumores primarios del Sistema Nervioso Central más frecuentes en adultos son los astrocitomas y los meningiomas, mientras que en niños son los meduloblastomas. La importancia de las hormonas sexuales en el desarrollo de estos tumores se ha estudiado debido a su incidencia dependiente del género, la presencia de los receptores a estas hormonas y los

efectos inhibidores de los antagonistas de los receptores hormonales sobre la proliferación tumoral. De acuerdo a los datos reportados, las hormonas sexuales juegan un papel importante en el desarrollo tumoral, ya que en general se ha observado que incrementan la proliferación e invasividad celulares. Además, el nivel de expresión de sus receptores se considera un factor de pronóstico y los antagonistas de los receptores prometen ser una alternativa terapéutica contra los distintos tumores cerebrales. Sin embargo, todavía se requieren estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales con el fin de diseñar posibles estrategias terapéuticas basadas en el conocimiento de las acciones de las hormonas sexuales en los tumores cerebrales.

Palabras clave: estradiol, progesterona, astrocitomas, meningiomas, meduloblastomas

Abstract

Sex hormones regulate different cell functions through the interaction with their nuclear receptors, which are ligand activated transcription factors. Sex hormone receptors have been strongly associated with tumor development, since they activate genes involved in cell growth and proliferation. The most frequent primary brain tumors in adults are astrocytomas and meningiomas, while in children the most frequent tumors are medulloblastomas. The relevance of sex hormones in tumor development has been studied based on the gender dependent incidence, the expression of sex hormone receptors and the effects of receptor antagonist on tumor cell proliferation. According to the reported data, sex hormones play an important role in tumor growth and development since they increase cell proliferation and invasion. Besides, the expression level of their receptors is considered an important prognosis factor, and the sex hormone receptor antagonists represent a promising therapy alternative. Nevertheless, several epidemiologic, clinical and experimental researches need to be done in order to improve therapeutic strategies for the different brain tumors.

Keywords: estradiol, progesterone, astrocytomas, meningiomas, medulloblastomas

Las hormonas sexuales y su mecanismo de acción

Las hormonas esteroides sexuales son moléculas derivadas del colesterol que se sintetizan en diversos órganos como son las gónadas, las glándulas adrenales y el Sistema Nervioso Central (SNC). Las hormonas sexuales más importantes son los estrógenos, progestágenos y andrógenos de los cuales los principales derivados activos son el estradiol (E2), la progesterona (P4) y la testosterona (T). Estas hormonas participan en diversos procesos fisiológicos entre los que se destaca la reproducción, aunque también participan en procesos no reproductivos como la memoria y el aprendizaje, la neuroprotección y la respuesta inmune, así como el crecimiento tumoral.

Las hormonas sexuales tienen múltiples células blanco sobre las cuales ejercen sus efectos a través de la interacción con sus receptores intracelulares, los cuales son factores de transcripción activados por ligando. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y comprende a los receptores a estrógenos α y β (RE α/β), los receptores a progesterona (RP-A y RP-B) y el receptor a andrógenos (RA) [1, 2]. El mecanismo de acción clásico o genómico de los receptores intracelulares involucra la inducción de la expresión génica. En ausencia de hormona los receptores se encuentran asociados a diversas proteínas como las de choque térmico (Hsp70/90) y en una conformación específica que les permite unir a la hormona con gran afinidad [3]. Las hormonas entran por difusión simple a la célula e interactúan con su receptor intracelular, lo que provoca un cambio conformacional en el receptor que promueve la disociación de sus proteínas chaperonas, la dimerización y fosforilación. El receptor activo se une a elementos de respuesta a hormonas localizados en las regiones reguladoras de los genes blanco y modulan su expresión mediante el reclutamiento de moléculas correguladoras (SRC-1 y CBP/p300) y de la maquinaria basal de la transcripción (Figura 1).

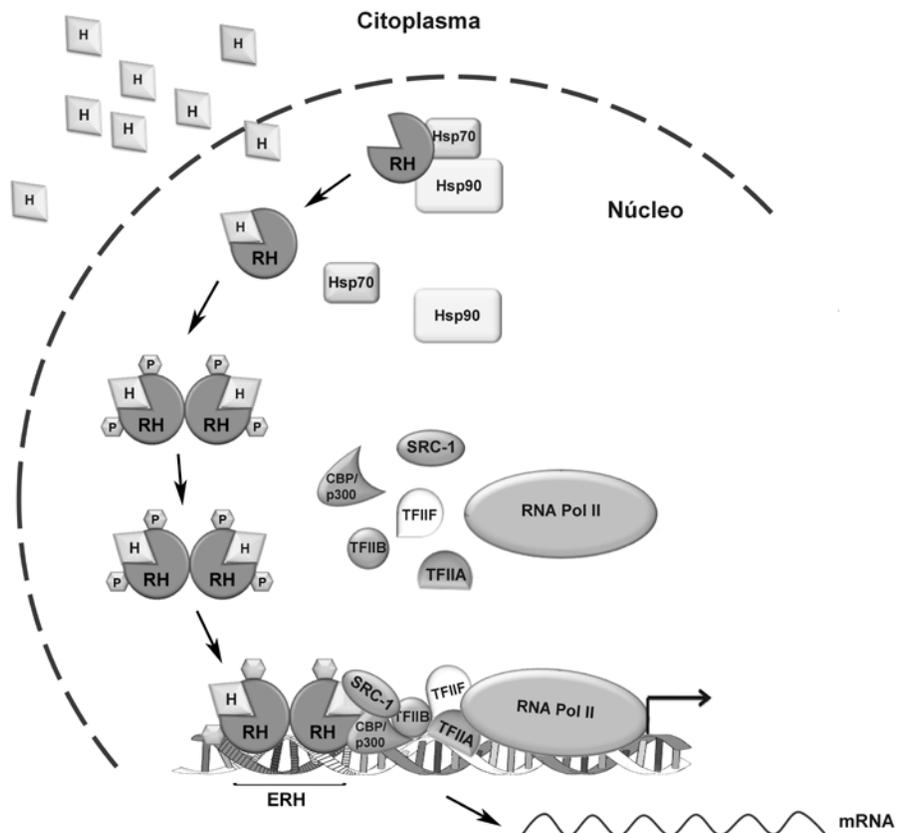


Figura 1. Mecanismo de acción clásico de las hormonas sexuales. En ausencia de hormona (H) el receptor hormonal (RH) se encuentra asociado a proteínas chaperonas como las de choque térmico Hsp70/90. Cuando la hormona entra a la célula y se une a su receptor, éste se disocia del complejo Hsp, se dimeriza y se fosforila (P). Una vez activo se une a elementos de respuesta a hormona (ERH) localizados en las regiones reguladoras de los genes blanco y recluta coactivadores (SCR-1 y CBP/p300) y a la maquinaria basal de la transcripción (RNA pol II, TFIIA/B/F) para inducir la expresión génica.

No obstante, estos receptores también pueden activar la transcripción al unirse al DNA de manera indirecta a través de factores de transcripción como las proteínas Sp1 y AP-1 [2, 4–6]. Una vez concluido el proceso de transcripción, los receptores son degradados a través de la vía ubiquitina-proteosoma [7, 8]. Por otro lado, las hormonas sexuales también tienen efectos no genómicos los cuales involucran a receptores membranales capaces de activar diversas cascadas de señalización [9]. En este trabajo nos enfocaremos en la importancia de los efectos de las hormonas sexuales y la expresión de sus receptores intracelulares en el desarrollo de tumores cerebrales.

Tumores primarios del Sistema Nervioso Central

Los tumores primarios del SNC conforman un grupo muy heterogéneo de tumores sólidos que surgen en distintas áreas del cerebro, tienen diferente potencial invasivo y un pronóstico variable. Entre los tumores del SNC, los gliomas y los meningiomas representan el 70% de los tumores primarios en adultos, mientras que los meduloblastomas representan el 15-20% de todos los tumores pediátricos. La etiología de estos tumores se desconoce y hasta el momento se han determinado como factores de riesgo a la radiación ionizante y algunos síndromes genéticos [10, American Brain Tumor Association www.abta.org]. De acuerdo a estudios clínicos, experimentales y epidemiológicos se ha sugerido que las hormonas sexuales juegan un papel importante en el desarrollo de estos tumores [10]. En los siguientes apartados se hará una breve revisión de los avances reportados sobre los efectos de las hormonas sexuales en los astrocitomas, meningiomas y meduloblastomas.

Astrocitomas

Los astrocitomas derivan de células gliales astrocíticas o de células troncales cancerosas, representan el 75% de todos los gliomas y son los tumores primarios más frecuentes y agresivos del SNC [11–13]. La frecuencia de los astrocitomas entre hombres y mujeres es de 3:2, observada principalmente en los tumores de mayor evolución [14]. Los astrocitomas están clasificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en cuatro grados (I-IV) de acuerdo a sus características histológicas. Los tumores de grado I son localizados y pueden ser eliminados por resección quirúrgica. Sin embargo, los astrocitomas de grados II y III presentan infiltración hacia el parénquima, por lo que se pueden volver mortales más rápidamente. Por último, los tumores de grado IV, también llamados glioblastomas, se les considera el tipo de glioma más agresivo, pues son letales en un lapso de 12 meses y son los más frecuentes, representando un 60% de todos los casos de astrocitomas. Las terapias para los astrocitomas de grados II-IV son la cirugía seguida de quimio y/o la radioterapia [11, 12, 15–17]. Sin embargo, estas terapias son poco eficientes para los tumores de mayor malignidad, pues la supervivencia de los pacientes es muy baja y la recurrencia de los tumores muy elevada. La expresión de los receptores a hormonas sexuales en astrocitomas [18, 19] ha sugerido la terapia hormonal como una alternativa terapéutica.

Los efectos del E2 sobre el crecimiento de los astrocitomas se han estudiado en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. En estudios con xenoinjertos se encontró que los ratones hembra sobreviven más que los machos debido a la presencia de los estrógenos [20]. También se ha reportado que el tratamiento con el metabolito del E2, 2-metoxiestradiol, induce muerte celular en líneas derivadas de gliomas humanos e inhibe el crecimiento del tumor en un modelo de glioma de ratón [21, 22]. De acuerdo a estos datos, el E2 podría tener un efecto de neuroprotección como se ha sugerido para patologías como el Alzheimer [23]. Sin embargo, se ha encontrado que líneas celulares de glioblastoma humano y de rata expresan la aromatasa, enzima encargada de la biosíntesis del E2. Esta enzima se expresa en condiciones fisiológicas, por lo que su presencia en células tumorales indica un papel importante de los estrógenos en el desarrollo del tumor [24].

Los estudios de la expresión del RE en astrocitomas son controvertidos. La expresión del RE se pierde en biopsias de astrocitomas humanos conforme incrementa el grado de evolución del tumor [25–27], mientras que sí se ha detectado en líneas celulares derivadas de astrocitomas de alto grado de malignidad [24, 28, 29]. Con respecto a las isoformas del receptor, el RE α se expresa en astrocitos y en tumores de bajo grado de malignidad y su expresión se pierde durante el desarrollo tumoral [30]. Sin embargo, en líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos de grados III (U373) y IV (D54) se encontró que el E2 promueve el crecimiento de las células mediante el RE α y el RE β . El RE α antagonista del receptor (ICI 182,780) bloquea el efecto de la hormona. Además, el RE α promueve la expresión de genes importantes para la proliferación celular como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la ciclina D1 [29]. En cuanto al RE β se ha reportado que se encuentra altamente expresado en astrocitomas de bajo grado de malignidad y que disminuye su expresión conforme aumenta el grado de evolución, por lo que se propone como un posible supresor de tumores [27, 31]. No obstante, otros estudios han identificado al RE β como la isoforma predominante en glioblastomas y un antagonista específico (liquiritigenina) inhibe la proliferación de los astrocitomas tanto *in vitro* como *in vivo* [31, 32]. Esto indica una gran heterogeneidad en la expresión del RE β en las células de glioblastomas y sugiere un papel relevante del receptor en el desarrollo de los tumores.

Además del RE se ha reportado que la P4 y sus receptores intracelulares juegan un papel importante en el crecimiento de los astrocitomas. Durante el embarazo, los niveles elevados de P4 promueven el crecimiento tumoral y tras el parto se reduce el tamaño del astrocitoma [33, 34]. El tratamiento con una

concentración fisiológica de P4 (10 nM) induce la proliferación de las líneas celulares U373 y D54, mientras que el antagonista del RP, mifepristona (RU486), bloquea el efecto de la hormona [35]. Estos efectos se deben a la regulación por P4 de genes importantes para la proliferación y metástasis como son VEGF, EGFR y ciclina D1 [36]. Contrario a estos resultados, Altinoz y colaboradores reportaron que la progestina medroxiprogesterona arresta en la fase S del ciclo celular a las células C6 de glioma de rata [37]. En estudios con xenoinjertos se encontró que el tratamiento con el antagonista RU486 reduce el tamaño del tumor [38] e inhibe el crecimiento de líneas celulares de glioblastoma [39]. Además, se ha sugerido como posible adyuvante para incrementar la eficiencia de la quimio y radioterapia empleada para el tratamiento de los astrocitomas [40].

La expresión del RP se correlaciona de manera directa con el grado de evolución de los astrocitomas, lo que sugiere que el RP tiene un fuerte potencial oncogénico en estos tumores [41]. Estudios por inmunohistoquímica muestran que los astrocitomas de grados III y IV expresan el RP en mayor proporción que los de grados I y II y que la isoforma predominante es RP-B [25, 26, 42, 43]. En líneas celulares de astrocitomas se ha encontrado una expresión diferencial de las isoformas del RP, pues en la línea U373 (grado III) se encontró una relación RP-B:RP-A de 3:1, mientras que en las células D54 (grado IV) se encontró una proporción equivalente [44, 45]. La tasa de expresión de las isoformas es importante, pues la P4 puede tener diversos efectos dependiendo del patrón de expresión de las mismas [46]. En cáncer de mama se ha reportado que los tumores que sobre-expresan RP-A tienen un peor pronóstico [47]. En cambio, en astrocitomas la sobre-expresión de RP-A inhibe el crecimiento de las células U373 tratadas con P4, lo que sugiere un posible efecto anti-proliferativo de esta isoforma [44]. Incluso, en biopsias de astrocitomas se encontró una relación inversamente proporcional entre la expresión de RP-A y el marcador de proliferación Ki-67 [43].

La expresión del RP es regulada por E2 en distintos tejidos como el útero, la glándula mamaria y el cerebro. Esta regulación se debe a la presencia de medios elementos de respuesta a estrógenos en el promotor del gen del RP. En cáncer de mama se ha reportado que el E2 induce principalmente la expresión de RP-B en células T47D y promueve la expresión de RP-A en células MCF7 [46]. En líneas celulares de astrocitomas humanos el RP se regula por E2, ya que el tratamiento con E2 (10n nM) incrementó el contenido de las isoformas del RP en las células U373, pero en la línea celular D54 no tuvo un efecto significativo. El contenido de las isoformas del RP no se modifica al tratar a las células con P4 (10 nM), pero se reduce su contenido, y en particular de la isoforma RP-A, al emplear

un tratamiento conjunto de E2 y P4 [44]. Estos estudios indican que en astrocitomas humanos el RP es regulado por E2, pero que su regulación puede variar de acuerdo al contexto celular y al grado de evolución del tumor.

Meningiomas

Los meningiomas son tumores que se originan principalmente de las células que forman la capa aracnoides y que cubren el cerebro y la médula espinal. Se estima que los meningiomas representan un 13-26% de todos los tumores primarios del SNC y la gran mayoría son tumores benignos, clasificados histológicamente por la OMS como grado I. No obstante, hay una baja incidencia de meningiomas atípicos (5-7%) clasificados como grado II y en algunos casos se presentan meningiomas malignos de grado III (2%). La incidencia de meningiomas incrementa con la edad, son más frecuentes en adultos de 60-70 años de edad y hay una mayor prevalencia en mujeres que en hombres en una proporción de 2:1. Los meningiomas son tumores de lento crecimiento y tienen un buen pronóstico, pues la supervivencia relativa mayor a los 5 años es de un 80% y permanece elevada (70%) incluso hasta los 15 años post-diagnóstico. La gran mayoría de los meningiomas pueden ser curados por resección quirúrgica total o tratados con radioterapia tras una resección parcial. Sin embargo, una edad avanzada y ser de género masculino son factores de pronóstico desfavorable [48, 49], lo que sugiere la participación de las hormonas sexuales en el desarrollo de estos tumores.

El efecto de las hormonas sexuales en el desarrollo y crecimiento de los meningiomas es controvertido. En estudios epidemiológicos se encontró que no existe mayor riesgo de presentar meningiomas en mujeres que hayan utilizado terapias anticonceptivas y de reemplazo hormonal [50]. En cambio, en un estudio retrospectivo se encontró una asociación positiva entre el uso de terapia de reemplazo hormonal y el diagnóstico de meningioma [51] así como un agravamiento reversible de los síntomas durante el embarazo [52].

La acción de los estrógenos y la expresión del RE ha sido poco estudiada y en general se considera que los meningiomas son RE negativos [53]. No obstante, por RT-PCR se ha reportado la expresión de ambas isoformas del receptor, RE α y RE β [54]. También se han reportado variantes que carecen de los exones 4 o 5 y que son transcripcionalmente inactivas (RE Δ 4) o que son incapaces de unir a la hormona (RE Δ 5), pero se desconoce su relevancia en el desarrollo tumoral [55]. El RE no se encuentra expresado en meninges sanas, pero sí en meningiomas de grado I y éstos tienen una mayor expresión que los tumores de mayor grado de

evolución. Esto podría sugerir al RE como un marcador de buen pronóstico [56–58]. Por otro lado, la aromatasa se expresa en tejido sano, pero no en meningiomas [58], lo que apunta a una posible pérdida de producción de E2 durante el desarrollo tumoral y una disminución consecuente de la expresión del RE en tumores malignos.

A pesar de que la participación de los estrógenos en el desarrollo de los meningiomas es debatida, la expresión del RP se ha considerado como un factor de pronóstico relevante. Es por ello que se han sugerido terapias para disminuir el crecimiento tumoral utilizando antagonistas del RP como el RU486, el cual se sabe que controla el crecimiento y reduce el tamaño del tumor en pacientes con meningiomas no resectados o recurrentes. El tratamiento a corto y largo plazo es bien tolerado por los pacientes, aunque se han reportado algunos efectos secundarios como la hiperplasia endometrial [59, 60]. En un modelo con ratones desnudos e implantados con células de meningioma, el tratamiento con RU486 redujo el volumen del tumor [61]. A pesar de que el RU486 no es empleado cotidianamente en la clínica, los estudios apuntan a ser utilizado como terapia adyuvante. En cultivos primarios de meningioma, el tratamiento con concentraciones crecientes de RU486 inhibe el crecimiento de las células, pero el efecto del antagonista es independiente de la expresión del RP y el tratamiento con 1 y 10 nM de P4 no induce el crecimiento de las células [61, 62]. Los estudios en cultivos *in vitro* de células derivadas de meningioma son escasos, pues al parecer se pierde la expresión del RP bajo estas condiciones [53, 63].

El RP se expresa en tejido sano en los cistos aracnoides y en las granulaciones aracnoideas [58, 64], lo que podría relacionarse con el hecho de que el 80% de los meningiomas son positivos para el RP. La expresión del RP es más frecuente y abundante en pacientes mujeres con meningioma que en hombres [49, 53], aunque se reportó una elevada expresión en hombres menores de 50 años [65]. En meningiomas malignos, la ausencia del RP está asociada a una elevada proliferación, un aumento en la apoptosis y una mayor recurrencia [66–68]. En un estudio con microarreglos donde examinaron el patrón de expresión génica asociado a la presencia de los receptores a hormonas sexuales se encontró que los genes localizados en el brazo largo del cromosoma 22 se encuentran sobre-expresados en tumores positivos para RP. En esa región se encuentra el gen de la neurofibromatosis tipo 2 (NF2), que mutado, es uno de los factores fundamentales para el desarrollo de la enfermedad [69, 70]. Estos datos sugieren que el RP podría participar en el inicio del desarrollo tumoral. Por otro lado, estudios en meningiomas de la médula espinal han reportado que el 86% de los tumores inmunopositivos para RP correlacionan con la expresión de la

metaloproteinasa MMP-9 [71], lo que indica que el RP podría promover la capacidad invasiva de las células.

La tasa de expresión de las isoformas del RP ha sido muy poco estudiada en estos tumores. Verheijen y colaboradores reportaron que la mayoría de los meningiomas RP positivos expresan más RP-A que RP-B [72]. Sin embargo, un año más tarde se reportó que la expresión de las isoformas del RP es equivalente [43]. En ambos casos no se determinó el grado de evolución del tumor, lo que podría alterar la tasa de expresión de ambas isoformas. Con respecto a la regulación de la expresión del RP, el grupo de Blankenstein ha buscado la posible participación de las isoformas truncas del RE (~~RE4~~ y REΔ5) en este proceso, pero al parecer la regulación del RP no está mediada por estrógenos como se ha reportado ampliamente para cáncer de mama [53]. Otros trabajos apuntan a la participación de otros factores, ya que la expresión de los coactivadores de receptores a hormonas esteroides SRC-1 y TIF2 correlaciona con la expresión del RP en estos tumores [73].

Meduloblastomas

Los meduloblastomas son tumores de rápido crecimiento que derivan de células precursoras del neuroectodermo y se desarrollan principalmente en el cerebelo (80% en el vermis y 20% en los hemisferios cerebelares) y con menos frecuencia en la corteza [74]. Representan el 2% del total de los tumores cerebrales y el 18% de los tumores pediátricos, por lo que son los tumores más frecuentes en la infancia, adolescencia y juventud. La incidencia anual es de 5 a 10 casos por millón de niños de entre 0 y 14 años de edad con un pico máximo hacia los 5 años de edad y un leve predominio en el género masculino [75, 76]. Estos tumores tienen una fuerte tendencia a diseminarse a lo largo del SNC, particularmente hacia el fluido cerebroespinal y las meninges, aunque se han encontrado metástasis fuera del SNC como en la médula ósea. La OMS ha clasificado a los meduloblastomas en cinco subtipos: clásicos, anaplásicos, meduloblastomas de células grandes, desmoplásicos nodulares y meduloblastomas con nodularidad extensiva [77]. Actualmente se ha propuesto una clasificación basada en la separación de subtipos celulares dividiendo a los tumores anaplásicos y de células grandes de los nodulares [78]. La malignidad de los meduloblastomas depende de la edad del paciente, el estatus metastásico y la presencia o ausencia de anaplasia difusa. Los pacientes con meduloblastoma considerados de riesgo promedio son los niños con más de tres años de edad, con

el tumor localizado y de subtipo no anaplásico, el resto de los pacientes que no presentan estas características se consideran de alto riesgo [79]. Clásicamente, los pacientes son tratados mediante escisión quirúrgica del tumor primario con radioterapia local y extensiva sobre el conjunto del eje neural. La quimioterapia adyuvante ha demostrado ser útil independientemente de la etapa de la enfermedad. Tanto el propio meduloblastoma como su tratamiento provocan secuelas a largo plazo como son trastornos endócrinos e intelectuales, especialmente cuando los niños son tratados a una edad temprana o cuando se presentan complicaciones en la cirugía [76].

Los efectos de las hormonas sexuales sobre el crecimiento de los meduloblastomas han sido muy poco estudiados, pero actualmente existen algunos reportes que han demostrado la presencia del RE. En las células precursoras de tumores neuroectodérmicos primitivos (TNEP), de las cuales se derivan los meduloblastomas y otros tipos de tumores, se expresan transitoriamente altos niveles de RE [80, 81]. Estudios en una línea celular derivada de TNEP (PSFK1) demostraron que estas células expresan variantes similares a las isoformas RE α y RE β y que el tratamiento con E2 a bajas concentraciones estimula rápidamente (15 minutos) la fosforilación y translocación nuclear de ERK1/2 [82]. El E2 también aumenta la migración de estas células a través de la transactivación de sus receptores nucleares mediada por la señalización de ERK. Sin embargo, el tratamiento con esta hormona no induce el crecimiento celular, lo anterior puede deberse a que estas células presentan una elevada estimulación de este evento producida por la señalización autócrina y parácrina de la vía de señalización de PDGF [82]. Estos resultados sugieren que las acciones de señalización rápida y la transactivación mediada por los RE participan en la invasividad de las células derivadas de TNEP.

Al igual que en células PFSK1, estudios en dos líneas celulares derivadas de meduloblastoma (Daoy y D283Med) demostraron la expresión de variantes del RE β . Por ensayos de inmunohistoquímica se ha encontrado que el RE β está altamente expresado en el 100% de biopsias de meduloblastomas primarios, mientras que RE α se expresa a bajos niveles en las células derivadas de meduloblastoma y solo el 41% de las biopsias estudiadas expresa este receptor [83]. Estudios con xenoinjertos también han confirmado que el E2 regula la invasión de células de meduloblastoma metastásico y el crecimiento del tumor *in vivo* y que agentes anti-estrogénicos como el ICI 162,780 bloquean eficazmente el crecimiento y la invasión del tumor [83, 84]. Estos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que los efectos de los estrógenos en el crecimiento e invasividad de los meduloblastomas podrían estar mediados por el RE. Contrario a esto, en

estudios realizados en un modelo *in vivo* de meduloblastoma generado en ratones mutados para el gen de un receptor de Sonic hedgehog, *Ptch1*, se encontró que el uso de un agonista específico del β RE (PPT) en estadios tempranos de la formación del tumor disminuye el desarrollo del meduloblastoma a través de vías antiproliferativas y pro-apoptóticas. En cambio, el agonista selectivo para α RE (PPT) no tuvo influencia alguna sobre la tumorigénesis [85]. Estos datos sugieren que en estadios tempranos del desarrollo de meduloblastomas, los estrógenos tiene un efecto protector contra el desarrollo del tumor mediado por el RE β . A pesar de que los datos muestran una relevancia en la participación del RE en el desarrollo tumoral, se requieren más investigaciones sobre las vías de señalización mediadas por estrógenos y sus receptores para explorar nuevos enfoques terapéuticos sin perder de vista el estadio del desarrollo del tumor.

Además de los efectos del E2 y su receptor en meduloblastomas no se han realizado estudios sobre la respuesta de estos tumores a tratamientos con P4 ni sobre la expresión de las isoformas del RP. Sin embargo, en una línea celular derivada de meduloblastoma humano (TE671) se encontró que el tratamiento con P4 disminuyó la transcripción del gen del Receptor para la Hormona Liberadora de Gonadotropinas tipo I (RHLG I) y el tratamiento con el antagonista del RP, el RU486, revirtió este efecto [86]. Estos resultados sugieren que la P4 regula la expresión del RHLG I a través de sus receptores. La acción de la P4 y la expresión de sus receptores en meduloblastoma aún requiere de una extensa investigación.

Conclusiones

Las hormonas sexuales como el E2 y la P4 juegan un papel importante en diferentes tipos de cáncer. En tumores primarios del SNC los efectos de estas hormonas (que en general inducen la proliferación celular) y la expresión de sus receptores son un factor a considerar a nivel clínico. Sin embargo, los efectos de las hormonas son muy variables dependiendo del modelo empleado para el estudio y del grado de evolución del tumor. Es por ello que se requieren realizar más investigaciones a nivel clínico y experimental, con el fin de determinar el papel que tiene cada hormona en los diferentes tipos de tumores cerebrales con el fin de desarrollar posibles terapias alternativas. Por ejemplo, la participación de los andrógenos en el desarrollo de los tumores del SNC no ha sido estudiada. Se ha reportado la expresión del RA en astrocitomas y meningiomas, pero no se han

realizado investigaciones con respecto a la importancia que pueda tener este receptor en el desarrollo de estos tumores [18, 19, 87].

Referencias

1. Ellmann, S., Sticht, H., Thiel, F., Beckmann, M. W., Strick, R., and Strissel, P. L. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2405–2426
2. Helsen, C., and Claessens, F. (2013) *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 97–106
3. Schülke, J.-P., Wochnik, G. M., Lang-Rollin, I., Gassen, N. C., Knapp, R. T., Berning, B., Yassouridis, A., and Rein, T. (2010) *PLoS One* **5**, e11717
4. Hagan, C. R., Faivre, E. J., and Lange, C. A. (2009) *Steroids* **74**, 568–572
5. Hernández-Hernández, O. T., and Camacho-Arroyo, I. (2013) *Mini Rev. Med. Chem.* **13**, 635–642
6. Mani, S. (2008) *Endocrinology* **149**, 2750–2756
7. Lange, C. A., Shen, T., and Horwitz, K. B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1032–1037
8. Villamar-Cruz, O., Manjarrez-Marmolejo, J., Alvarado, R., and Camacho-Arroyo, I. (2006) *Brain Res. Bull.* **69**, 276–281
9. Sakamoto, H., Takahashi, H., Matsuda, K.-I., Nishi, M., Takanami, K., Ogoshi, M., Sakamoto, T., and Kawata, M. (2012) *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **17**, 996–1019
10. Cowppli-Bony, A., Bouvier, G., Rué, M., Loiseau, H., Vital, A., Lebailly, P., Fabbro-Peray, P., and Baldi, I. (2011) *Cancer Causes Control* **22**, 697–714
11. Louis, D. N. (2006) *Annu. Rev. Pathol.* **1**, 97–117
12. Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. A., and Cavenee, W. K. (2007) *Genes Dev.* **21**, 2683–2710
13. Ahmed, A. U., Auffinger, B., and Lesniak, M. S. (2013) *Expert Rev. Neurother.* **13**, 545–555
14. Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., and Wrensch, M. (2006) *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2**, 494–503
15. Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 479–489
16. Alcántara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E. L., Li, Y., Burns, D. K., Alvarez-Buylla, A., and Parada, L. F. (2009) *Cancer Cell* **15**, 45–56
17. Vishwakarma, S., Paspala, S., Bardia, A., Tiwari, S., and Khan, A. (2013) *Adv. Cancer Res. Treat.* **2013**, 1–18
18. Paoletti, P., Butti, G., Zibera, C., Scerrati, M., Gibelli, N., Roselli, R., Magrassi, L., Sica, G., Rossi, G., and Robustelli della Cuna, G. (1990) *J. Neurosurg.* **73**, 736–742
19. Arevalo, M.-A., Santos-Galindo, M., Bellini, M.-J., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 1106–1112

20. Barone, T. A., Gorski, J. W., Greenberg, S. J., and Plunkett, R. J. (2009) *J. Neurooncol.* **95**, 37–48
21. Lis, A., Ciesielski, M. J., Barone, T. A., Scott, B. E., Fenstermaker, R. A., and Plunkett, R. J. (2004) *Cancer Lett.* **213**, 57–65
22. Chamaon, K., Stojek, J., Kanakis, D., Braeuninger, S., Kirches, E., Krause, G., Mawrin, C., and Dietzmann, K. (2005) *J. Neurooncol.* **72**, 11–16
23. Petrovska, S., Dejanova, B., and Jurisic, V. (2012) *J. Physiol. Biochem.* **68**, 455–460
24. Yague, J. G., Lavaque, E., Carretero, J., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M. (2004) *Neurosci. Lett.* **368**, 279–284
25. Carroll, R. S., Zhang, J., Dashner, K., Sar, M., and Black, P. M. (1995) *Neurosurgery* **37**, 496–503
26. González-Agüero, G., Ondarza, R., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., and Camacho-Arroyo, I. (2001) *Brain Res. Bull.* **56**, 43–48
27. Batistatou, A., Stefanou, D., Goussia, A., Arkoumani, E., Papavassiliou, A. G., and Agnantis, N. J. (2004) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **130**, 405–410
28. Leslie, K. K., Keefe, D., Powell, S., and Naftolin, F. (1994) *J. Soc. Gynecol. Investig.* **1**, 238–244
29. González-Arenas, A., Hansberg-Pastor, V., Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., Henderson-Villalpando, J., Lemus-Hernández, D., Cruz-Barrios, A., Rivas-Suárez, M., and Camacho-Arroyo, I. (2012) *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 379–386
30. Kabat, G. C., Etgen, A. M., and Rohan, T. E. (2010) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **19**, 2421–2427
31. Sareddy, G. R., Nair, B. C., Gonugunta, V. K., Zhang, Q., Brenner, A., Brann, D. W., Tekmal, R. R., and Vadlamudi, R. K. (2012) *Mol. Cancer Ther.* **11**, 1174–1182
32. Li, W., Winters, A., Poteet, E., Ryou, M.-G., Lin, S., Hao, S., Wu, Z., Yuan, F., Hatanpaa, K. J., Simpkins, J. W., and Yang, S.-H. (2013) *Brain Res.* **1503**, 97–107
33. Pallud, J., Mandonnet, E., Deroulers, C., Fontaine, D., Badoual, M., Capelle, L., Guillet-May, F., Page, P., Peruzzi, P., Jouanneau, E., Frenay, M., Cartalat-Carel, S., Duffau, H., and Taillandier, L. (2010) *Ann. Neurol.* **67**, 398–404
34. Scarrott, L. J., Raina, A., Madej, T., and Rajesh, U. (2012) *J. Obstet. Gynaecol.* **32**, 704–705
35. González-Agüero, G., Gutiérrez, A. A., González-Espinosa, D., Solano, J. D., Morales, R., González-Arenas, A., Cabrera-Muñoz, E., and Camacho-Arroyo, I. (2007) *Endocrine* **32**, 129–135
36. Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., and Camacho-Arroyo, I. (2012) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **132**, 127–134
37. Altinoz, M. A., Bilir, A., Ozar, E., Onar, F. D., and Sav, A. (2001) *Int. J. Dev. Neurosci.* **19**, 541–547
38. Pinski, J., Halmos, G., Shirahige, Y., Wittliff, J. L., and Schally, A. V. (1993) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 1388–1392

39. Ramaswamy, R., Ashton, K., Lea, R., Roberts, P., Davis, C. H., Golash, A., and Dawson, T. (2012) *Br. J. Neurosurg.* **26**, 336–339
40. Llaguno-Munive, M., Medina, L. A., Jurado, R., Romero-Piña, M., and Garcia-Lopez, P. (2013) *Cancer Cell Int.* **13**, 29-36
41. Khalid, H., Shibata, S., Kishikawa, M., Yasunaga, A., Iseki, M., and Hiura, T. (1997) *Cancer* **80**, 2133–2140
42. Assimakopoulou, M., Sotiropoulou-Bonikou, G., Maraziotis, T., and Varakis, J. (1998) *Clin. Neuropathol.* **17**, 27–34
43. Inoue, T., Akahira, J.-I., Suzuki, T., Darnel, A. D., Kaneko, C., Takahashi, K., Hatori, M., Shirane, R., Kumabe, T., Kurokawa, Y., Satomi, S., and Sasano, H. (2002) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 5325–5331
44. Cabrera-Muñoz, E., González-Arenas, A., Saqui-Salces, M., Camacho, J., Larrea, F., García-Becerra, R., and Camacho-Arroyo, I. (2009) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **113**, 80–84
45. Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Peña-Ortiz, M. A., García-Gómez, E., Rodríguez-Dorantes, M., and Camacho-Arroyo, I. (2013) *Steroids* **78**, 500–507
46. Jacobsen, B. M., and Horwitz, K. B. (2012) *Mol. Cell. Endocrinol.* **357**, 18–29
47. Graham, J. D., Yager, M. L., Hill, H. D., Byth, K., O'Neill, G. M., and Clarke, C. L. (2005) *Mol. Endocrinol.* **19**, 2713–2735
48. Sankila, R., Kallio, M., Jääskeläinen, J., and Hakulinen, T. (1992) *Cancer* **70**, 1568–1576
49. Marosi, C., Hassler, M., Roessler, K., Reni, M., Sant, M., Mazza, E., and Vecht, C. (2008) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **67**, 153–171
50. Korhonen, K., Auvinen, A., Lyytinen, H., Ylikorkala, O., and Pukkala, E. (2012) *Am. J. Epidemiol.* **175**, 309–314
51. Blihshteyn, S., Crook, J. E., and Jaeckle, K. a (2008) *J. Clin. Oncol.* **26**, 279–282
52. Chow, M. S., Mercier, P. a, Omahen, D. a, Wood, S. L., and Johnson, J.-A. M. (2013) *Obstet. Gynecol.* **121**, 475–478
53. Blankenstein, M. a, Verheijen, F. M., Jacobs, J. M., Donker, T. H., van Duijnhoven, M. W., and Thijssen, J. H. (2000) *Steroids* **65**, 795–800
54. Carroll, R. S., Zhang, J., and Black, P. M. (1999) *J. Neurooncol.* **42**, 109–116
55. Blankenstein, M. a, Koehorst, S. G., van der Kallen, C. J., Jacobs, H. M., van Spriël, a B., Donker, G. H., van't Verlaat, J. W., Blaauw, G., and Thijssen, J. H. (1995) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**, 361–365
56. Fakhrou, A., Meshkini, A., and Shadravan, S. (2012) *Pak. J. Biol. Sci.* **15**, 530–535
57. Korhonen, K., Salminen, T., Raitanen, J., Auvinen, A., Isola, J., and Haapasalo, H. (2006) *J. Neurooncol.* **80**, 1–7
58. Leães, C. G. S., Meurer, R. T., Coutinho, L. B., Ferreira, N. P., Pereira-Lima, J. F. S., and da Costa Oliveira, M. (2010) *Neuropathology* **30**, 44–49
59. Grunberg, S. M., Weiss, M. H., Russell, C. A., Spitz, I. M., Ahmadi, J., Sadun, A., and Sitruk-Ware, R. (2006) *Cancer Invest.* **24**, 727–733

60. Spitz, I. M., Grunberg, S. M., Chabbert-Buffet, N., Lindenberg, T., Gelber, H., and Sitruk-Ware, R. (2005) *Fertil. Steril.* **84**, 1719–1726
61. Matsuda, Y., Kawamoto, K., Kiya, K., Kurisu, K., Sugiyama, K., and Uozumi, T. (1994) *J. Neurosurg.* **80**, 527–534
62. Blankenstein, M. a, van der Meulen-Dijk, C., and Thijssen, J. H. (1989) *J. Steroid Biochem.* **34**, 419–421
63. Black, P., Carroll, R., and Zhang, J. (1996) *Acta Neurochir. Suppl.* **65**, 50–53
64. Verhagen, A., Go, K. G., Visser, G. M., Blankenstein, M. A., and Vaalburg, W. (1995) *Br. J. Neurosurg.* **9**, 47–50
65. Wolfsberger, S., Doostkam, S., Boecher-Schwarz, H.-G., Roessler, K., van Trotsenburg, M., Hainfellner, J. a, and Knosp, E. (2004) *Neurosurg. Rev.* **27**, 238–245
66. Roser, F., Nakamura, M., Bellinzona, M., Rosahl, S. K., Ostertag, H., and Samii, M. (2004) *J. Clin. Pathol.* **57**, 1033–1037
67. Mukherjee, S., Ghosh, S. N., Chatterjee, U., and Chatterjee, S. (2011) *Neurol. India* **59**, 817–822
68. Baxter, D. S., Orrego, A., Rosenfeld, J. V, and Mathiesen, T. (2013) *J. Clin. Neurosci.*, 6–11
69. Claus, E. B., Park, P. J., Carroll, R., Chan, J., and Black, P. M. (2008) *Cancer Res.* **68**, 314–322
70. Wiemels, J., Wrensch, M., and Claus, E. B. (2010) *J. Neurooncol.* **99**, 307–314
71. Barresi, V., Alafaci, C., Caffo, M., Barresi, G., and Tuccari, G. (2012) *Pathol. Res. Pract.* **208**, 350–355
72. Verheijen, F. M., Sprong, M., Jacobs, H. M., Donker, G. H., Amelink, G. J., Thijssen, J. H., and Blankenstein, M. a (2001) *Eur. J. Cancer* **37**, 1488–1495
73. Carroll, R. S., Brown, M., Zhang, J., Dizenzo, J., Mora, J. F. De, and Black, P. M. (2000) *Clin. Cancer Res* **6**, 3570–3575
74. Wechsler-Reya, R., and Scott, M. P. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 385–428
75. McKean-Cowdin, R., Razavi, P., Barrington-Trimis, J., Baldwin, R. T., Asgharzadeh, S., Cockburn, M., Tihan, T., and Preston-Martin, S. (2013) *J. Neurooncol.* **115**, 153–160
76. Gajjar, A., Packer, R. J., Foreman, N. K., Cohen, K., Haas-Kogan, D., and Merchant, T. E. (2013) *Pediatr. Blood Cancer* **60**, 1022–1026
77. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007) *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109
78. Leary, S. E. S., and Olson, J. M. (2012) *Curr. Opin. Pediatr.* **24**, 33–39
79. Packer, R. J., Rood, B. R., and MacDonald, T. J. (2003) *Pediatr. Neurosurg.* **39**, 60–67
80. Jakab, R. L., Wong, J. K., and Belcher, S. M. (2001) *J. Comp. Neurol.* **430**, 396–409
81. Zsarnovszky, A., and Belcher, S. M. (2001) *Brain Res. Dev. Brain Res.* **129**, 39–46
82. Kirby, M., Zsarnovszky, A., and Belcher, S. M. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 753–758

83. Belcher, S. M., Ma, X., and Le, H. H. (2009) *Endocrinology* **150**, 1112–1121
84. Belcher, S. M. (2008) *Brain Res. Rev.* **57**, 481–492
85. Mancuso, M., Leonardi, S., Giardullo, P., Pasquali, E., Borra, F., Stefano, I. De, Prisco, M. G., Tanori, M., Scambia, G., Majo, V. Di, Pazzaglia, S., Saran, A., and Gallo, D. (2011) *Cancer Lett.* **308**, 197–202
86. An, B.-S., Choi, J.-H., Choi, K.-C., and Leung, P. C. K. (2005) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 1106–1113
87. Carroll, R. S., Zhang, J., Dashner, K., Sar, M., Wilson, E. M., and Black, P. M. (1995) *J. Neurosurg.* **82**, 453–460

Semblanza del Dr. Ignacio Camacho Arroyo



Ignacio nació en el Estado de México en 1962. Es biólogo por la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. con Maestría y Doctorado en Investigación Biomédica Básica también por la U.N.A.M. De 1993 a 1995 ocupó la plaza de Investigador Asociado “C” en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición para después integrarse como Profesor de Carrera de la Facultad de Química de la U.N.A.M. Actualmente es Profesor de Carrera Titular “C” Definitivo de Tiempo Completo en dicha Facultad y es Miembro del Sistema Nacional de Investigadores en el nivel III.

Ha impartido cursos desde hace 27 años en la U.N.A.M. a nivel licenciatura y posgrado. Su área de investigación es la Neuroendocrinología y se ha enfocado al estudio de las funciones y los mecanismos de acción de las hormonas sexuales. Es autor de 115 publicaciones en revistas indizadas y sus trabajos han merecido más de 1,500 citas. Ha publicado además 7 capítulos de libros internacionales y 11 nacionales, así como 7 artículos de enseñanza y divulgación de la ciencia. Es editor de un libro a nivel internacional sobre endocrinología y otro nacional sobre hormonas esteroides y pertenece a 8 Sociedades Científicas.

Ha coordinado 27 proyectos de Servicio Social, ha dirigido 25 tesis de licenciatura, 8 de maestría y 9 de doctorado y ha formado varios grupos de

investigación. Ha realizado múltiples actividades de divulgación de la ciencia en diferentes medios de comunicación. Ha obtenido diversos reconocimientos, entre los que destacan: la Distinción Universidad Nacional para Jóvenes Académicos en el Área de Docencia en Ciencias Naturales por la U.N.A.M. en el 2002; el Premio “Alfonso Rivera” de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología otorgado por trayectoria en Investigación en Endocrinología para Jóvenes Investigadores en el 2004; la Cátedra “Dr. Carlos Beyer Flores” por la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (2007-2008). Fue miembro de la terna para la Dirección de la Facultad de Química de la U.N.A.M. en el 2009 y en el 2011.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 145-164, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014).
(<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

MEDICINA DARWINIANA: EL DESARROLLO DEL SÍNDROME METABÓLICO DESDE UNA PERSPECTIVA EVOLUTIVA.

DARWINIAN MEDICINE: THE DEVELOPMENT OF METABOLIC SYNDROME FROM AN EVOLUTIONARY PERSPECTIVE.

Ma. Esther Rubio Ruiz, Verónica Guarner-Lans y Ana E. Peredo Escárcega.

Departamento de Fisiología. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", México, D.F.

Resumen

La medicina darwiniana es la aplicación de la ciencia básica de la biología evolucionaria a la medicina. Esta corriente propone que las enfermedades contemporáneas como el síndrome metabólico y la obesidad, resultan de la incompatibilidad entre la información genética y las modificaciones adaptativas adquiridas en medios primitivos, expuesto a nuevos estilos de vida. Estas exposiciones de los individuos a medio ambientes diferentes (intrauterino, la lactancia y la niñez) quedan "grabadas" en el ADN y pueden transmitirse de una generación a otra.

Estos conceptos no sólo tienen una relevancia teórica para la comprensión de las enfermedades, sino también pueden influenciar el manejo o la prevención

de ellas. Actualmente, se ha recurrido a la restricción calórica así como a la administración de compuestos naturales como estrategias útiles para el control del síndrome metabólico y la obesidad. Uno de estos compuestos es el resveratrol, un polifenol presente en la piel de las uvas, que regula la expresión génica activando a las Sirtuinas. Estas enzimas son desacetilasas de histonas y de algunos factores de transcripción que regulan rutas metabólicas involucradas en el desarrollo de patologías cardiovasculares, envejecimiento y resistencia al estrés.

Palabras clave: Síndrome metabólico, obesidad, medicina darwiniana, epigenética, evolución humana.

Abstract

Darwinian medicine is the application of basic sciences such as evolutionary biology to medicine. This discipline suggests that contemporary diseases such as metabolic syndrome and obesity are the result of incompatibility between genetic information and primitively acquired adaptive modifications through evolution and the discordance when the individuals are exposed to new lifestyles. The exposure of individuals to modified environments during different developmental stages (intrauterine, infancy and childhood) from those in which we evolved are "recorded" in the DNA and can be inherited to the next generation.

These concepts have not only theoretical relevance for the understanding of diseases, but may also influence their prevention and treatment. Nowadays, calorie restriction and the use of natural compounds are employed as strategies for controlling metabolic syndrome and obesity. One of these compounds is resveratrol, a polyphenol present in the skin of grapes, which regulates gene expression by activating Sirtuins. These enzymes are histone deacetylases and of some transcription factors that regulate metabolic pathways involved in the development of cardiovascular diseases, aging and stress resistance.

Keywords: Metabolic syndrome, obesity, darwinian medicine, epigenetics, human evolution.

Medicina Darwiniana

La medicina evolutiva o darwiniana es una nueva corriente que propone que las enfermedades contemporáneas resultan en grado variable de la

incompatibilidad entre las modificaciones adaptativas adquiridas en medios primitivos y finalmente transmitidos a un individuo expuesto a nuevos estilos de vida.

La Medicina Darwiniana coloca a los humanos en un ámbito biológico, tratando de interpretar nuestras características, fortalezas y limitaciones en un contexto evolutivo, interpretándonos a los humanos como resultado de un largo y complejo proceso evolutivo, que ha dejado sus huellas tanto en genomas como en nuestra anatomía y fisiología, y que muchas de nuestras enfermedades se pueden entender y analizar, (y tal vez tratar) de manera provechosa tomando en cuenta los principios básicos de la ecología evolutiva, de la genética de poblaciones y de la moderna genómica evolutiva.

El diseño de los seres vivos fue seleccionado naturalmente durante la evolución para garantizar una sobrevivencia óptima hasta alcanzar la edad reproductiva. Las condiciones actuales de vida, con mejores condiciones higiénicas, medicina preventiva y curativa y desarrollos socio-económicos y políticos han incrementado la expectativa de vida de manera que gran parte de la población vive muchos años por encima de su fase reproductiva.

Paul Ewald, uno de los creadores de la medicina evolucionista, sostiene desde 1980 (y plasmado en su libro *Evolution of Infectious Diseases* de 1994) que muchas enfermedades se deben a parásitos y otros patógenos e infecciones que han ido evolucionando con la raza humana. Así, junto con él, otros investigadores como Robert May y Bruce Levin han hecho un trabajo muy importante para entender la evolución de las enfermedades, la evolución y desarrollo de la patogénesis, así como la dinámica evolutiva de la relación hospedero-patógeno.

George Williams y Radolph Nesse, en el artículo *The dawn of Darwinian medicine* (“El amanecer de la medicina darwiniana”) y posteriormente en el libro *Why we get sick? (¿Por qué nos enfermamos?)* (1994), ya se referían a reacciones como la fiebre, la tos, las náuseas y el vómito como estrategias evolutivas (para la conservación de la especie) que presentan los individuos para deshacerse de organismos patógenos [1-3].

La perspectiva evolucionista también permite explicar por qué subsisten órganos como el apéndice, sin ninguna función aparente. Es el vestigio de una cavidad que nuestros ancestros usaban para la digestión, pero como hace muchos siglos que ya no cumple esa función, y puede traer graves consecuencias para la salud si se infecta, es que hoy se recomienda extraerlo cuando se inflama.

Otro ejemplo de los mecanismos que sirvieron en su momento y que ahora pueden contribuir al desarrollo de enfermedades son los fenómenos pro-coagulatorios y de contracción vascular. Estos sistemas se desarrollaron para que nuestros antepasados no murieran desangrados ante cada golpe; pero hoy, ese exceso de coagulación es una de las causas de la aterosclerosis.

Lamarck y la epigenética

En 1809, Jean-Baptiste Pierre Antoine de Monet, Caballero de la Marck (Lamarck), publicó la primera teoría evolutiva: *Philosophie zoologique: ou exposition des Considérations relatives à l'histoire naturelle des animaux*. La teoría de la evolución de Lamarck puede resumirse en dos conceptos. El primero es que los organismos se vuelven más complejos gradual y progresivamente por una "causa primaria". El segundo es que esta progresión se ve influida por condiciones externas: el medio ambiente ejerce una gran influencia sobre los animales, y como resultado de esta influencia y del uso creciente y sostenido o desuso de cualquier órgano se modifica su organización y su forma. Este segundo concepto conduce a la idea bien conocida de Lamarck de la herencia de caracteres adquiridos. Aunque la herencia de los caracteres adquiridos fue negada por la mayor parte de los biólogos del siglo XX, en la actualidad se ha postulado que la epigenética pudiera ser el sustento para este tipo de herencia [4].

El término epigenética fue acuñado por Waddington en 1957 en su libro: *The strategy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical biology* para referirse a los cambios en el fenotipo causado por cualquier otro medio diferente a los cambios en la secuencia de DNA. La epigenética se refiere ahora más directamente a las alteraciones del DNA y la cromatina que regulan la expresión de los genes. Este proceso incluye la metilación del DNA y una multitud de modificaciones diferentes de las histonas. Las normas que rigen el establecimiento de marcas epigenéticas aún no se entienden todavía completamente, pero es claro que la epigenética es dinámica y el medio ambiente ejerce una influencia clave. Las marcas epigenéticas son un reflejo de las exposiciones ambientales de un individuo durante su vida y pueden transmitirse de una generación a otra.

Anteriormente se pensaba que el estado epigenético del genoma se borraba de una generación a otra, pero hay evidencia creciente de que existe la herencia epigenética transgeneracional.

Las bases genéticas de las enfermedades son muy complejas, y actualmente son objeto de minuciosos estudios genéticos, involucrando millones de dólares y cientos y a veces miles de personas.

Por otro lado, el ambiente afecta a los fenotipos de manera diversa, desde antes de que un bebe nazca, el ambiente materno es crítico en términos de recursos para el desarrollo fetal y la expresión de los genes. Una vez que el bebe nace está sujeto al ambiente externo del cual obtiene no sólo alimentos sino también aire y agua por lo que la calidad del aire, del agua, y de sus nutrientes determina que tan expuesto está a contaminantes que pueden afectar su esperanza de vida y capacidad reproductiva. Además hay que recordar que somos víctimas de virus, bacteria y otros parásitos que nos atacan sin misericordia y que también pueden afectar seriamente nuestra sobrevivencia.

Etapas Nutricionales de Nuestra Evolución.

El estudio de la alimentación de nuestros ancestros a lo largo de la evolución de la especie humana puede ayudarnos a entender la función de la insulina y de la resistencia a la insulina. Nos permite, además, entender la aparición del “**mono obeso**” y cómo y por qué los individuos que conservan el genotipo “ahorrador” en una circunstancia de abundancia de alimentos nos podrían predisponer a desarrollar el síndrome metabólico.

Primera etapa: El *Ardipithecus ramidus*, un primate muy parecido al chimpancé actual, vivía entre finales del Mioceno y comienzos del Plioceno (entre 15 y 6 millones de años), en bosques tropicales húmedos y cálidos. Esta etapa corresponde a una etapa de nuestra evolución caracterizada nutricionalmente por la abundancia permanente de alimentos, en su mayor parte de origen vegetal. Estos ancestros eran vegetarianos frugívoros y folívoros que obtendrían el complemento necesario de proteínas y de grasa mediante la ingestión ocasional de algunos insectos, reptiles o pequeños mamíferos. El procesamiento de los nutrientes y en particular de la glucosa debía estar regido por la insulina por lo que su sistema celular tendría una gran sensibilidad, lo que permitía una asimilación eficiente de la glucosa. El nivel de actividad física debía ser elevado ya que su vida transcurría entre las ramas de los árboles caminando trayectos cortos a cuatro patas [5].

Segunda etapa: Coincide con la pérdida de las selvas húmedas en la que evolucionaron nuestros primeros ancestros hace aproximadamente 5 millones de

años. En esta fase nos enfrentamos a la escasez de alimentos y a periodos de hambruna que serían una constante en el resto de millones de años de evolución. Un representante de esta fase de nuestra evolución es el *Australopithecus afarensis*, la famosa “Lucy” ya con bipedestación quien se alimentaba de raíces y vegetales menos nutritivos y más escasos. Este nuevo tipo de alimento necesitaba de digestiones largas y de laboriosas fermentaciones en el intestino para extraer la energía. Complementaba su dieta con las proteínas y la grasa que proporcionaba la ingestión de los invertebrados y de pequeños animales que lograba atrapar. La insulina se requería para absorber la glucosa pero en el caso de estos individuos se requería una estrategia metabólica diferente. Cada vez que encontraba comida abundante, su metabolismo debería poder reservar una porción de esa abundancia para los momentos de escasez y eso sólo se puede lograr guardando el exceso de nutrientes en forma de grasa en el tejido adiposo. El truco utilizado por la selección natural, apoyada en una serie de mutaciones genéticas, fue el desarrollo de una sensibilidad diferencial a la acción de la insulina. Algunos tejidos desarrollaron una resistencia a la acción de la insulina como el músculo, mientras el resto de las células continuaron con la sensibilidad elevada. Como muchas células tienen una capacidad fija de utilizar glucosa, el azúcar sobrante se almacenaba en forma de grasa. De esta manera la evolución seleccionó un genotipo “ahorrador” y nació el mono obeso.

La teoría del genotipo ahorrador fue propuesta por Neel (1969) y propone que genes “económicos” (o genes “diabéticos”, heredados hasta nuestros días, fueron seleccionados a lo largo de la evolución del ser humano durante el tiempo en el que los recursos (el alimento) eran escasos, del tal manera que cuando el alimento se encontraba disponible, una vez cubiertos los requerimientos energéticos inmediatos, el excedente era almacenado en forma de grasa para ser utilizada durante los largos periodos de ayuno hasta que se contara de nuevo con mas alimento. Sin embargo, esta condición metabólica que resultaba ser benéfica para la supervivencia durante periodos de “ayuno” (hambre) de nuestros ancestros, actualmente puede originar resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 u obesidad. De esta manera Neel explica la relación del bajo peso al nacer y la alta incidencia a padecer diabetes en la edad adulta [5].

Tercera etapa: Hace 2 millones de años, nuestros ancestros, a causa de la escasez de los alimentos de origen vegetal, se vieron obligados a alimentarse de animales terrestres y acuáticos. Esta etapa permitió el crecimiento del cerebro, el cual propició la capacidad de elaborar instrumentos de piedra y el inicio de la colonización del mundo. El representante mejor conocido de este periodo es el *Homo ergaster*. La alimentación se volvió rica en proteínas y grasas y muy pobre

en azúcares. Cuando se digieren las proteínas de la carne, en el intestino aparecen aminoácidos, muy poca glucosa y algo de grasa. La absorción de estos nutrientes desencadena un pequeño aumento de la secreción de insulina y se corre el riesgo de que la hormona introduzca dentro de las células la escasa glucosa absorbida y desencadene una hipoglucemia. La solución de la selección natural para resolver esta situación fue potenciar la resistencia a la insulina en el músculo y el hígado ya que esto permite sobrevivir una dieta pobre en carbohidratos y rica en proteína. La resistencia a la insulina también fue la clave para sobrevivir los períodos de hambruna, etapas en las cuales recurrían a metabolizar las reservas de grasa. El grado de actividad física de estos ancestros era elevado fuera por deambular a través de las sabanas inmensas en busca de alimento o para huir de algún peligro.

Cuarta etapa: 1ª parte: Nuestros antecesores abandonaron África hace doscientos mil años y ocuparon el mundo desplazando y eliminando al resto de los homínidos que lo habitaban. Hace unos cien mil años los *Homo sapiens* colonizaron Europa y Asia y tuvieron que padecer miles de años de glaciación, alimentándose exclusivamente de la caza y de la pesca. La alimentación de estos antepasados directos era muy abundante en proteínas de origen animal, y escasa en hidratos de carbono y en grasa. 2ª parte: Hace unos quince mil años terminó la última glaciación y comenzó el desarrollo de la agricultura, la ganadería y posteriormente la civilización. Esto permitió que los individuos de la especie humana se encontraran con una variedad de alimentos y una abundancia nunca conocidos desde que algunos de nuestros antecesores habitaron las selvas húmedas del trópico. Las poblaciones humanas habitan en un mundo “obesogénico” con niveles bajos de gasto energético debido al sedentarismo y fuentes de alimento muy abundantes, con acceso en el mercado a productos baratos ricos en grasas y carbohidratos simples los cuales contribuyen a balances energéticos positivos haciendo que crezca la tasa de obesidad y de enfermedades metabólicas crónicas [5].

El Síndrome Metabólico como una enfermedad derivada de la desadaptación de nuestro diseño biológico a la alimentación actual.

A causa de que nuestros primeros ancestros, los *Ardipithecus ramidus*, vivieron durante millones de años en bosques y entornos de hidratos de carbono, el feto, la placenta y el cerebro evolucionaron en una dependencia casi exclusiva de la glucosa como combustible. Por eso, cualquier alteración de la alimentación durante el embarazo puede producir graves problemas. La programación embrionaria es un proceso bien documentado en animales por el cual la desnutrición y otras influencias adversas, al actuar durante los primeros períodos de la vida, cambian permanentemente la estructura y función de todo el organismo. Si la madre embarazada está desnutrida, su recién nacido mostrará cambios fisiológicos y bioquímicos permanentes que son adaptativos y capacitan al feto para sobrevivir y crecer, aun a costa de efectos indeseables a largo plazo; estas adaptaciones alteran permanentemente la fisiología y el metabolismo de tal forma que conducen al síndrome metabólico (SM) y a la enfermedad cardiovascular en la vida adulta. De manera similar, cambios en la alimentación durante etapas críticas postnatales como la ventana crítica del páncreas predisponen a un mayor riesgo de padecer enfermedades en la edad adulta.

La diabetes, la obesidad, la hipertensión, la hiperlipidemia o la aterosclerosis no son enfermedades que se presenten de manera aislada y única, salvo en contadas ocasiones; lo más frecuente es que se presenten asociadas. Reaven a finales de la década de 1980 las agrupó dándoles el nombre de síndrome X y describió que el posible origen de todos ellos era la resistencia a la insulina. La Organización Mundial de la Salud lo adoptó la asociación de estas patologías a finales de los 90's con el nombre de síndrome metabólico y además, amplió el número de procesos patológicos englobados en dicho síndrome abarcando todos aquellos que también son causados por la resistencia a la insulina.

El SM es una enfermedad compleja y heterogénea con alta prevalencia en México y que actualmente se considera una epidemia. Los síntomas del SM se acentúa con la edad y las personas con este síndrome tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

Ventanas críticas del desarrollo.

Está bien documentado que los cambios en el ambiente durante las primeras etapas de la vida, nos pueden predisponer a desarrollar enfermedades como la obesidad, la diabetes, hipertensión y síndrome metabólico.

Algunos estudios en rata han demostrado que el páncreas, al igual que otros órganos, tiene una ventana crítica durante el primer mes de vida la cual tiene repercusiones en la regulación corporal de glucosa y podría ser un elemento a considerar en la fisiopatología de la diabetes mellitus. En la rata, este periodo inicia al nacimiento y es seguido por el período de la lactancia hasta el destete en el día 21. La alimentación en esta etapa está constituida por leche materna la cual está formada predominantemente por grasas. En las ratas, si la dieta es cambiada por una dieta rica en carbohidratos, se desarrolla hiperinsulinemia y obesidad en la etapa adulta. El primer mes de vida en la rata determina la homeostasis de la glucosa. Durante este período de tiempo, los niveles de glucosa y de insulina se encuentran elevados y disminuyen en el momento del destete. El glucagón decrece durante el primer mes y del día 6 al 12 postnatal sus niveles son incluso más altos que los de la insulina. Una disminución en la tasa insulina/glucagón induce glucogenólisis, gluconeogénesis y síntesis de cuerpos cetónicos. Se ha propuesto que los altos niveles circulantes de cortisol pudieran ser la causa de los niveles elevados de glucosa. Hacia el día 20 postnatal, las células beta han estado expuestas a altos niveles de cortisol y glucosa por tiempo prolongado, lo cual induciría a una pérdida reversible de la sensibilidad a la glucosa y estimularían la secreción de insulina. Por lo anterior, el período neonatal se caracteriza por hiperglucemia y resistencia a la insulina, parecidas a las que se observan en ratas que desarrollan SM [6,7].

Si se cambia la dieta durante el período de la lactancia en la rata se observa hiperinsulinemia e hiperglucagonemia, la función secretora de las células beta se altera y se observan cambios morfológicos en el páncreas. Estos cambios programan el funcionamiento de los islotes pancreáticos en la rata adulta haciendo que los animales mantengan la hiperinsulinemia en la etapa posterior a la lactancia y eventualmente conducen a obesidad en el animal adulto [7].

Tabla I. Peso corporal y parámetros bioquímicos durante el primer mes de vida de la rata.

Día	Peso corporal (g)	Glucosa (mg/dL/g)	Insulina (pg /ml /g)
12	28.47 ± 1.88	6.19 ± 0.29	9.66 ± 1.53
21	44.04 ± 2.52 *	3.48 ± 0.19 *	5.73 ± 0.67 *
28	86.37 ± 1.54 *	1.87 ± 0.11 *	1.99 ± 0.23 *

Los valores se expresan por gramo de peso corporal para compensar el crecimiento. Los datos se muestran como el promedio ± error estándar. * p<0.05 vs. edad previa; n= 15 para glucosa y n= 8 para insulina.

De manera similar, el estado nutricional durante la etapa de la lactancia en los humanos también se ha visto que puede determinar el desarrollo de intolerancia a la glucosa en el adulto y este a su vez, predispone al desarrollo de diabetes tipo 2. Por otra parte, el bajo peso al nacimiento en el humano es predictivo no sólo de obesidad y diabetes pero también de hipertensión, resistencia a la insulina y mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Además de las acciones metabólicas clásicas de la insulina, esta hormona desempeña otras funciones importantes que ayudan a mantener la homeostasis cardiovascular. Esto lo logra al actuar en órganos como el corazón o en el endotelio vascular en donde puede inducir la producción y liberación de agentes vasoactivos como el óxido nítrico (potente agente vasodilatador), la Angiotensina II y la endotelina-1 (ET-1), vasoconstrictores [8-10].

La ET-1 es un péptido sintetizado por las células endoteliales que desempeña un papel importante en varios desórdenes cardiovasculares como algunas formas de hipertensión, daño miocárdico y en el síndrome metabólico. La insulina en concentraciones fisiológicas y suprafisiológicas regula, a la alta, la producción y liberación de ET-1 contribuyendo así al desarrollo de la hipertensión en el síndrome metabólico.

Estos cambios en las concentraciones de glucosa e insulina, afectan el equilibrio de la síntesis de factores vasoconstrictores liberados por el endotelio (como la ET-1) y que traen como consecuencia la modificación en las respuestas vasculares.

Cambios Epigenéticos y el Síndrome Metabólico

Hasta hace no mucho tiempo se pensaba que las enfermedades dependían únicamente de la interacción entre los genes y el ambiente en el momento actual o como consecuencia de la evolución. En la actualidad se sabe que se pueden inducir cambios persistentes en la estructura y función de los tejidos a través de cambios en el ambiente los cuales actúan alterando la regulación de la transcripción de los genes durante las etapas tempranas del desarrollo. A estos cambios se les conoce como cambios epigenéticos, y pueden programar desde etapas tempranas del desarrollo un posible riesgo en la salud que puede ser heredable.

El epigenoma de una célula constituye un historial de su ambiente durante el desarrollo. Cuando el ambiente cambia durante nuestra vida y no es igual al ambiente en el que nos desarrollamos, el riesgo de enfermedades aumenta.

Actualmente se ha descrito que tanto el síndrome metabólico, la obesidad y la hipertensión, pueden tener su origen durante el desarrollo intrauterino o en la niñez debido a cambios epigenéticos [11].

Los cambios epigenéticos incluyen:

- A) la metilación del ADN: la adición de un grupo metilo a los nucleótidos, generalmente en la región promotora, que contienen dinucleótidos citosina - guanosa (CpG) sitios que desempeñan un papel fundamental en el control de la expresión génica tejido-específico. La metilación de los residuos de citosina regula la transcripción directamente mediante la inhibición de la unión de específicos factores de transcripción.
- B) la modificación de histonas que consiste en la acetilación mediada por desacetilasas de histonas (HDAC) y/o metilación de las proteínas que se encargan de empaquetar los cromosomas,
- C) la actividad de RNA no-codificante (ncRNAs) RNAs de diferentes longitudes (pequeños RNAs, microRNAs y grandes RNAs) han demostrado desempeñar un papel importante modulando la actividad de proteínas al regular procesos de transcripción y traducción. Cada vez hay más evidencia del papel regulador de los ncRNAs durante el desarrollo y en respuesta al estrés así como a algunos estímulos ambientales [12].

Un ejemplo de regulación epigenética es la producción de insulina. Esta hormona es el regulador principal de la homeostasis metabólica y se secreta en respuesta a la estimulación por nutrientes. En los ratones y los seres humanos, la

expresión y secreción de la insulina son controladas mediante la metilación de sitios específicos CpG en la región promotora del gen. Además, los miRNAs juegan un papel importante en la producción y la secreción de esta hormona y los niveles de varios miARN en las células beta son regulados por nutrientes como la glucosa [13,14].

Modificaciones Epigenéticas Como Herramienta Terapéutica Para el Control del Síndrome Metabólico.

Para el tratamiento del SM en primera instancia se recomienda que el paciente modifique su estilo de vida: disminuyendo la ingesta de grasas saturadas y carbohidratos (restricción calórica) e incrementando su actividad física. La mayoría de los pacientes necesitan terapias farmacológicas adicionales (habituales para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y de la diabetes tipo II) como estatinas, fibratos, metformina, tiazolidinedionas y bajas dosis de aspirina.

La restricción calórica está estrechamente relacionada con la estructura, estabilidad y función de la cromatina en tejidos específicos y se sabe que es capaz de regular diferentes procesos metabólicos, así como el envejecimiento [15]. Uno de los factores mediante los cuales la restricción calórica induce cambios en la cromatina es mediante la activación de un tipo específico de desacetilasas de histonas (dependientes de NAD^+) y ADP-ribosiltransferasas conocidas como sirtuinas (SIRT1-7 en mamíferos). Las sirtuinas son una familia de proteínas presentes en diferentes compartimentos celulares, que se han asociado a procesos metabólicos, longevidad y resistencia al estrés [16].

Con el descubrimiento de las proteínas SIRT se ha demostrado la existencia de una nueva misión para el NAD^+ en la regulación transcripcional. Por tanto, el mantenimiento de los niveles de NAD^+ en la célula, es un requisito importante para la expresión y actividad de las sirtuinas. El requerimiento de NAD^+ implica que las SIRT funcionan como sensor de energía o sensor redox que conecta el metabolismo energético con la regulación transcripcional (Tabla II).

Plantas Medicinales

Una línea interesante de investigación para el tratamiento del síndrome metabólico, es el estudio de las plantas medicinales. Recientemente se ha

centrado la atención a los efectos benéficos que tienen algunos compuestos naturales presentes en las frutas y vegetales en la prevención y/o tratamiento de algunas enfermedades como el cáncer, desórdenes neurológicos, diabetes, obesidad e hipertensión. Esta actividad biológica se ha atribuido en parte, a la activación de algunas clases de proteínas SIRT por los polifenoles de estos compuestos.

Tabla II. Características principales de las sirtuinas de mamíferos.

	Localización intracelular	Actividad	Proteínas blanco	Función biológica
SIRT 1	Núcleo	Deacetilasa	PGC-1 α , FOXO, NF- κ B	Metabolismo/ Inflamación/ Neurodegeneración
SIRT 2	Citoplasma	Deacetilasa	H4, α -tubulina	Ciclo celular/tumorogénesis
SIRT 3	Núcleo y mitocondria	Deacetilasa	Ace-CS2	Metabolismo
SIRT 4	Mitocondria	ADP-ribosil transferasa	GDH	Secreción de insulina
SIRT 5	Mitocondria	Deacetilasa	Desconocida	Desconocida
SIRT 6	Núcleo (heterocromatina)	ADP-ribosil transferasa	DNA-polimerasa α	Reparación de ADN
SIRT 7	Núcleo y nucleolo	Desconocida	RNA-polimerasa I	Transcripción de ADNr

Existen otros mecanismos de acción propuestos para explicar los efectos de los compuestos naturales como su potente actividad antioxidante y antiinflamatoria; funcionando como “scavengers” o atrapadores de los radicales libres, así como modificando la transcripción génica mediante la inducción o inhibición de factores de transcripción específicos.

El resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) es un compuesto fenólico que se encuentra de forma natural en varias especies de plantas, particularmente en la piel y en las semillas de las uvas y sus derivados. El resveratrol se ha caracterizado como una fitoalexina, un compuesto anti-infeccioso producido por las plantas como respuesta a una lesión causada por daños por agentes patógenos, a la deficiencia de nutrientes, variaciones en la temperatura así como a otros factores de estrés [17,18].

El resveratrol es actualmente un tema de numerosos estudios sobre sus efectos en animales y en los seres humanos. Los efectos del resveratrol en la esperanza de vida de muchos organismos modelo como *D. melanogaster* y *C. elegans*, siguen en controversia. También existen algunos reportes sobre el efecto anticancerígeno, antiinflamatorio e hipoglucémico del resveratrol al administrarlo a ratas y ratones, sin embargo el mecanismo de acción por el cual el resveratrol ejerce este efecto, no está completamente estudiado [19].

La quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona) es uno de los flavonoides más ampliamente distribuido y es el componente principal del extracto de *Gingo biloba*; también está presente en frutas y hortalizas. Como antioxidante previene la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la expresión de la metaloproteína 1, inhibiendo así la ruptura de las placas ateroscleróticas y contribuyendo entonces a la estabilización de la placa [20].

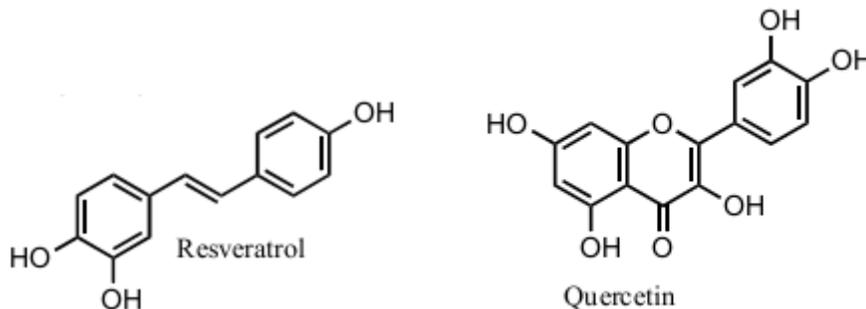


Figura 1. Fórmulas de compuestos naturales con uso potencial para el tratamiento del MS.

Debido a estos antecedentes, en el laboratorio, nos encontramos en la primera fase de experimentación al administrarle a un modelo animal de síndrome metabólico, una mezcla de resveratrol (RSV) y quercetina (QRC) encontrando que estos polifenoles son eficaces para el control del síndrome metabólico.

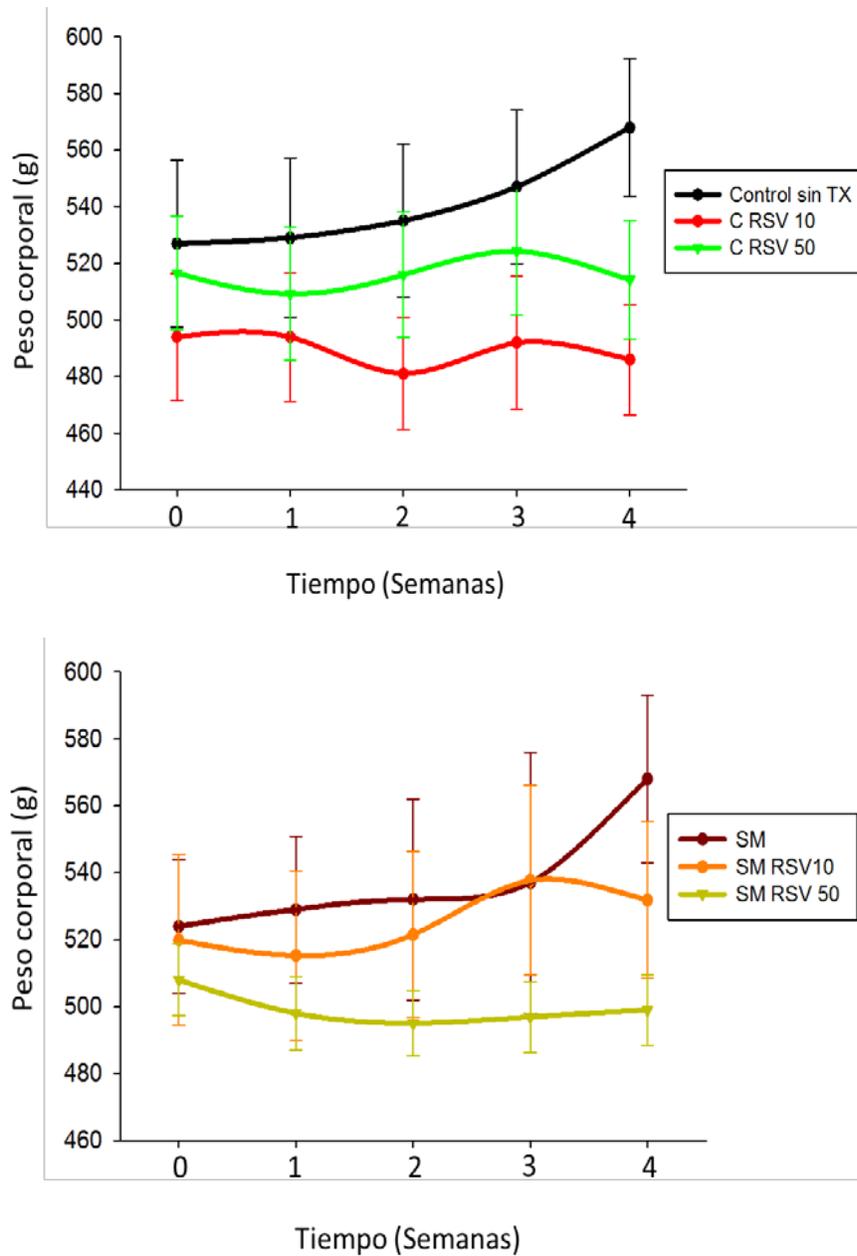


Figura 2. Efecto del RSV y QRC en el peso corporal del grupo control y con SM durante el tratamiento.

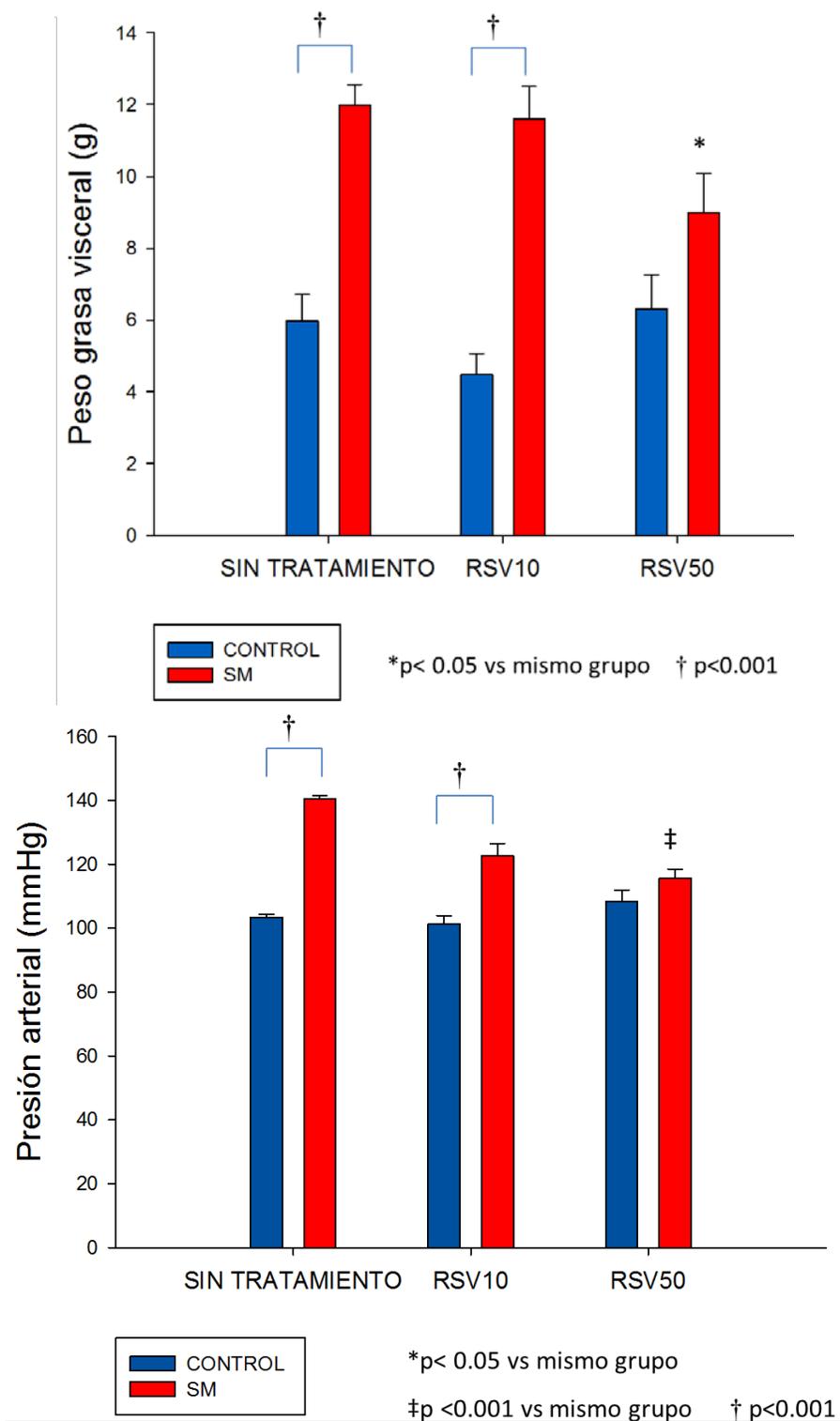


Figura 3. Efecto del RSV y QRC en el desarrollo de la adiposidad central y de la hipertensión arterial en el modelo de ratas con SM.

Nuestros resultados muestran que la combinación de resveratrol y quercetina disminuyen los signos del SM. Disminuyeron los niveles de grasa central 25%, que se vieron reflejados en la pérdida de peso corporal, disminuyó en forma significativa la concentración de triglicéridos y la presión arterial. Finalmente, la mezcla del RSV y QRC aumenta la sensibilidad a la insulina (indicada por el índice HOMA-IR) (Tabla III).

Tabla III. Comparación de variables de ratas control y SM tratadas con diferentes dosis de RSV y QRC.

GRUPO	GLUCOSA (mg/dl)	INSULINA (ng/ml)	HOMA IR	COLESTEROL (mg/dl)	LEPTINA (ng/ml)
C	100.2± 6.95	0.2491±0.03	1.2633± 0.24	61.2± 5.6	2.774± 0.89
C RSV10	75.4± 2.93	0.0824± 0.01*	0.3195± 0.06*	59.2± 3.73	3.5377± 0.6
C RSV50	92.3± 11.72	0.2369± 0.04	1.0873± 0.14	59.3±4.18	3.125± 0.95
SM	90± 2.30	0.449± 0.06 ∞	2.3479± 0.23 ∞	59±5.70	5.2374± 0.44∞
SM RSV10	82.5± 4.01	0.232± 0.01 † ‡	0.997± 0.1 † ‡	63.3± 2.44	5.3245 ± 0.4 ∞
SM RSV50	88.4± 2.52	0.205± 0.02 ‡	0.9091± 0.13‡	59.2± 3.88	5.2107± 1.08

Los valores son medias ± error estándar; HOMA-IR homeostatic model assessment of insulin resistance; n=8; ∞P<0.05 contra C misma dosis; †P<0.01 vs. C misma dosis; ‡P<0.05 contra el mismo grupo diferente tratamiento; †‡P<0.01 contra el mismo grupo diferente tratamiento.

Conclusiones

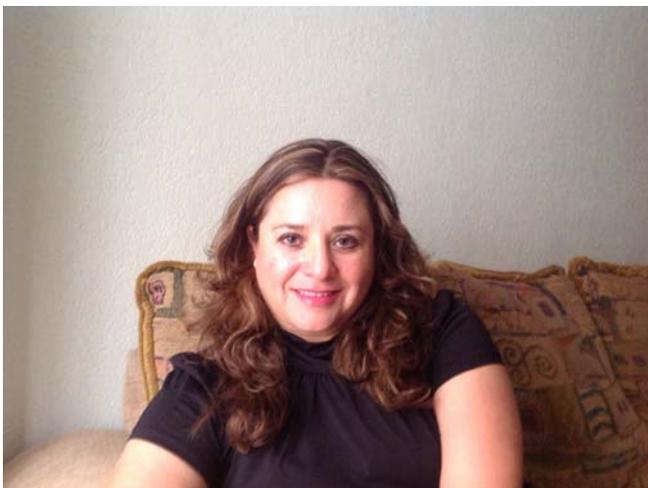
El Síndrome Metabólico es una patología heterogénea que se presenta como consecuencia de una desadaptación del metabolismo con el que evolucionamos con respecto al tipo de vida actual. Debemos tratar de adecuar nuestra alimentación al diseño evolutivo de nuestro organismo. Así mismo, debemos cuidar la alimentación de la mujer durante el embarazo y la lactancia y cuidar la alimentación del recién nacido durante el periodo de la ventana crítica del páncreas para evitar el desarrollo de la obesidad y del síndrome metabólico.

Una vez que el síndrome metabólico está presente, los compuestos naturales como el resveratrol y la quercetina son una herramienta útil en el tratamiento de esta patología.

Referencias

1. Williams, G., y Nesse, RM. (1991) *Q Rev Biol.* **66**, 1-22
2. Williams, G. y Nesse, RM. (1996) Phoenix ISBN-13: 978-1857995060.
3. Williams, G. y Nesse RM. (2004) Vintage. ISBN: 0-679-74674-9.
4. Eguarte LE., Souza V., Guarner-Lans V. "Evolución y salud" en: *Cardiología Evolutiva.* (2012) Editores: Gustavo Sánchez Torres y Verónica Guarner-Lans. Págs: 1-15. ISBN: 978-1105-51702-0
5. Guarner-Lans V., Rubio-Ruiz ME "La desadaptación a la alimentación actual como origen del Síndrome Metabólico" en: *Cardiología Evolutiva.* (2012) Editores: Gustavo Sánchez Torres y Verónica Guarner-Lans. Págs: 107-115. ISBN: 978-1105-51702-0
6. Guarner-Lans V. "Implicaciones evolutivas del bajo peso al nacer en el desarrollo de riesgo a enfermedades en el adulto. en: *Cardiología Evolutiva.* (2012) Editores: Gustavo Sánchez Torres y Verónica Guarner-Lans. Págs: 94-99. ISBN: 978-1105-51702-0
7. Rubio-Ruiz ME., Vargas-González A., Monter-Garrido M., et. al (2010) *Heart Vessels.* **25**, 248-253.
8. Kamide K., Rakugi H., Nagai M., et. al. (2004) *J Hypertens* **22**,121-127
9. Lee DH., Lee JU., Kang DG., et. al. (2001) *Metabolism* **50**, 74-78
10. Nyby MD., Abedi K., Smutko V., et. al. (2007) *Hypertens Res* **30**, 451-457
11. Guarner-Lans V. y Rubio-Ruiz ME. (2011) *J Diabetes Metab*, **S:2**
12. Kaikkonen, MU., Lam, MT., Glass, CK. (2011) *Cardiovasc Res* **90**, 430-440
13. Kuroda, A., Rauch, TA., Todorov, I., et al. (2009) *PLoS One* **4**, 6953
14. Tang, X., Muniappan, L., Tang, G., et. al (2009) *RNA* **15**, 287-293
15. Vaquero, A., Reinberg, D. (2009) *Genes Dev* **23**, 1849-1869
16. Liou, GG., Tanny, JC., Kruger, RG., et. al. (2005) *Cell*; **121**, 515-527
17. Calabrese, EJ., Mattson, MP., Calabrese, V. (2010) *Hum Exp Toxicology* **29**, 980-1015
18. Ungvari, Z., Bagi, Z., Feher, A., et. al. (2010) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**, H18 - H24
19. Surh, YJ. y Na HK. (2008) *Genes Nutr* **2**, 313–317
20. Rubio-Ruiz, ME., El Hafidi, MI., Pérez –Torres, G. et. Al. (2013) *Current Medical Chemistry* **20**, 2626-2640

Semblanza de la M. en C. Ma. Esther Rubio Ruiz



Estudió la licenciatura en Biología en la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, cursó la Maestría en Ciencias en la Facultad de Ciencias de la UNAM y posteriormente el doctorado en Ciencias Biomédicas en la misma Institución.

Se ha desempeñado como profesor de asignatura en la Facultad de Ciencias y en la Facultad de Medicina de la UNAM impartiendo cursos de Biología de Procariontes y Bioquímica y Biología Molecular.

Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel 1. Actualmente es Investigadora del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” desarrollando diversas líneas de investigación en un modelo murino de Síndrome Metabólico.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 165-174, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014).
(<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

EFFECTO DE UNA DIETA HIPERCALÓRICA EN EL DESARROLLO DE DISLIPIDEMIA Y DISGLUCEMIA Y SU IMPACTO EN LA CITOARQUITECTURA RENAL.

THE EFFECT OF A HYPERCALORIC DIET ON THE DEVELOPMENT OF DYSGLYCEMIA AND DYSLIPEMIA ITS IMPACT ON THE KIDNEY CYTOARCHITECTURE.

José Ángel Flores¹, Alfonso Díaz², Samuel Treviño^{1,3}, Eduardo M. Brambila^{1,3}.

¹ Departamento de Análisis Clínicos, Laboratorio de Investigaciones Nefrourológicas, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP, Puebla, CP72570, México.

² Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas. BUAP. Puebla, CP72570, México.

³ Departamento de Análisis Clínicos, Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas, Posgrado en Ciencias Químicas; BUAP.
quimicoangel32@hotmail.com

Resumen

Enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes y la hipertensión, junto con el síndrome metabólico, están causando cada vez más insuficiencia renal crónica. Para la comprensión de las vías de señalización y mecanismos moleculares que las involucran, la investigación en modelos de roedores que imiten los cambios observados en los seres humanos es esencial; uno de los

principales criterios es que los modelos de roedores inicien todos los signos descritos en los seres humanos con síndrome metabólico, especialmente disglucemia y dislipemia, y generar cambios en la tasa de filtración glomerular que conducen a la generación de la enfermedad renal crónica, la observación histológica de los cambios glomerulares y tubulares proximales son puntos clave en el desarrollo de la patología renal. Finalmente, la exposición y consumo crónico de una dieta hipercalórica propicia cambios citoarquitectónicos clásicos de nefrosclerosis diabética, los cuales son bioquímicamente evidenciados por la pérdida de la selectividad en el filtrado y en la absorción tubular de glucosa y albúmina, así como, la drástica disminución de la TFG; mientras que a nivel histológico se incrementa la glicación e infiltración colagenoide, pérdida del espacio de Bowman, hipertrofia glomérulo – tubular e incremento en la matriz extracelular mesangial.

Palabras clave: Dislipidemia, disglucemia, tasa de filtrado glomerular, arquitectura renal.

Abstract

Chronic diseases such as obesity, diabetes and hypertension, along with the metabolic syndrome, are causing increasing chronic renal failure. Comprise signaling pathways and molecular mechanisms that involve, research in rodent models that mimic the changes observed in humans is essential, a major criteria is that rodent models start all the signs described in humans with metabolic syndrome, especially dysglycemia and dyslipidemia, and generate changes in glomerular filtration rate leading to the generation of chronic renal disease, histological observation of changes glomerular and proximal tubular are key points in the development of renal pathology. Finally, chronic consumption of a high-calorie diet promotes diabetic nephrosclerosis and changes in the renal cytoarchitecture, which are biochemically evidenced by a loss in glomerulus selectivity and the tubular absorption of glucose and albumin, as well as the decline in GFR. Histological evidence show it increases the glycation and collagen infiltration, also there is a loss of Bowman's space, hypertrophy of glomerulus and tubule, and increases in extracellular matrix of mesangial cells.

Keywords: Dyslipidemia, dysglycemia, glomerular filtration rate, Kidney cytoarchitecture.

Introducción

La malnutrición en todas sus formas - deficiencias de nutrientes, sobrepeso y obesidad - impone un alto costo económico y social en el mundo. El desequilibrio energético debido al excesivo consumo calórico en relación al gasto energético, reflejo del sedentarismo y falta de actividad física inducen el aumento de la masa adipocitaria a través de mecanismos de hipertrofia e hiperplasia del adipocito, la cual es la principal explicación del desarrollo de obesidad [1]. Estimaciones recientes de la FAO (Food and Agricultural Organization) indican que 868 millones de personas están subnutridas calóricamente, así mismo 1.4 mil millones de personas tienen sobrepeso, de los cuales 500 millones son obesos [2]. Según datos de la encuesta nacional de salud y nutrición 2012 (ENSANUT 2012) en México la prevalencia combinada de sobrepeso-obesidad (IMC ≥ 25 kg/m²) es mayor en las mujeres (73.0%) que en los hombres (69.4%). Por lo que actualmente es indispensable considerar al excesivo consumo calórico y consecuentemente la obesidad como factores predisponentes de patologías crónico degenerativas que propician gastos económicos importantes, por lo que deben ser consideradas como una de las principales prioridades en la agenda nacional [3].

El tejido adiposo constituye uno de los órganos clave en la homeostasis energética, evidencias recientes demuestra que el tejido adiposo -incluyendo preadipocitos, adipocitos (blanco y café) y tejido estromal- desempeña un papel central en la homeostasis energética; siendo capaz de regular sus propias características funcionales y morfológicas de acuerdo con las condiciones fisiológicas o patológicas predominantes, en la actualidad el tejido adiposo se considera como un órgano con actividad tanto autócrina, parácrina y endocrina, la cual regula la homeostasis de adipocinas pro y anti-inflamatorias que contribuyen a la inflamación asociada con la obesidad [4, 5].

Actualmente en la obesidad los ácidos grasos libres (AGL) provenientes de la lipólisis en condiciones de desequilibrio energético e inflamación son liberados por el adipocito, e interfieren en la señalización intracelular desencadenada por la insulina y con el metabolismo de lípidos y carbohidratos por lo que se consideran causa y consecuencia del síndrome metabólico (SM), la resistencia a la insulina (RI), la hiperinsulinemia compensatoria y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), con obvia repercusión en el funcionamiento renal [6,7]. La relación causal entre la obesidad y proteinuria fue reportado por primera vez en 1974; actualmente diversas vías de señalización como el incremento del factor de crecimiento similar

a la insulina tipo 1 (IGF-1) y la activación del sistema renina-angiotensina (SRAA) -inducible por la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y dislipidemia-, la inflamación y el estrés oxidativo, han sido señalados como iniciadoras del sufrimiento y daño renal que culmina en insuficiencia renal crónica (IRC) asociada a la obesidad [7, 8].

La ocurrencia de enfermedades metabólicas en humanos hace urgente la necesidad de estudios para el entendimiento de sus causas, los mecanismos de progresión, los métodos de diagnóstico e intervenciones terapéuticas de muchas patologías humanas. Estos estudios requieren modelos animales viables que simulen en gran parte los aspectos primordiales que se observan en las enfermedades humanas; así, enfermedades metabólicas crónicas son replicadas en modelos de roedores, al demostrarse la existencia de correlación con los signos presentes en enfermedades humanas como obesidad, hipertensión, diabetes, enfermedades cardiovasculares y recientemente, dislipidemias, hígado graso no alcohólico, disfunción renal, resistencia a la insulina, disglucemia y síndrome metabólico. Los modelos más comunes reportados en la literatura son a base de aloxano y estreptozotocina [10]. Químicamente producen hígado graso, inflamación, hiperglicemia, pero contrariamente al síndrome metabólico se observa hipoinsulinemia y no hay ganancia de peso; semejándose más a la diabetes mellitus tipo 1. Se han desarrollado mediante dosis bajas de estreptozotocina modelos con hiperglicemia, decremento de HDL, pero sin alteraciones en otros lípidos, ausencia de cambios en las enzimas oxidativas y sin el desarrollo de hipertensión. Por lo que la evidencia científica es insuficiente para afirmar que la estreptozotocina es inductora de síndrome metabólico [11, 12].

Así mismo, se han desarrollado modelos genéticos para el estudio de la obesidad y la diabetes incluyen a los ratones *db/db* (C57L/Ks) y *ob/ob*, ratas Zucker, Otsuka Long-Evans Tokushima, Fatty; estos modelos son útiles en la evaluación de los mecanismos moleculares específicos que pueden estar implicados en el curso temporal de las patologías, ya que presentan desarrollo de obesidad, hiperglicemias con resistencia a insulina y dislipidemias con hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y reducción de la relación HDL/LDL. Como en el caso de ratones *db/db* con mutación autosómica recesiva en el gen que codifica al receptor de Leptina presente en el cromosoma 4 [13-15], ratones *ob/ob* (C57BL/6J-*ob/ob*), que además desarrollan esteatosis hepática [16-20], ratas Zucker obesas diabéticas (ZDF *fa/fa*) con mutación en el gen del receptor de leptina [21,22], e incremento de TNF α e IL - 1 β [23]; en estos modelos se ha observado presencia de albuminuria y engrosamiento de la membrana basal

glomerular [24]. Las ratas Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLEFT) se han utilizado como un modelo de obesidad y diabetes similar al humano, en ellas se ha observado el desarrollo de esclerosis glomerular [25]. Pero el síndrome metabólico en los humanos no es un trastorno monogénico, por lo tanto, las preguntas de que si estos cambios genéticos son similares a los observados en los seres humanos, y si estos modelos muestran la gama de signos que caracterizan al síndrome metabólico no podrían ser resueltas en su totalidad por estos modelos animales.

Recientemente se ha estudiado en modelos animales, el impacto que tiene la dieta en el desarrollo de complicaciones como el síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y el hígado graso no alcohólico [26]; así, se han descrito estudios con roedores con dietas ricas en carbohidratos, grasa o combinaciones que imitan los hábitos nutricionales de diferentes poblaciones humanas. Las dietas hiperlipídicas se han utilizado como modelos para el estudio de la obesidad, la dislipidemia y la resistencia a la insulina en roedores, oscilado entre el 20 y el 60 % de aporte a la dieta. El sostenimiento a largo plazo de la dieta hiperlipídica ha mostrado estados moderados de hiperglucemia e intolerancia a la glucosa, y disminución de la sensibilidad a la insulina con hiperinsulinemia compensadora en la mayoría de las cepas de ratas y ratones estudiadas [27,28]. Se ha evidenciado que las dietas hiperlipídicas inducen disfunción endotelial [29], albuminuria, incremento del área penacho glomerular con depósitos de colágeno, expansión mesangial, aumento de la infiltración de macrófagos en médula renal y esteatosis renal [30].

Así mismo, el principal carbohidrato utilizado para lograr desregulaciones metabólicas importantes es la fructosa, uno de los edulcorantes más empleados en dietas tipo occidental y se ha correlacionado el aumento de su ingesta con obesidad [31]. En roedores puede inducir síntomas de síndrome metabólico como resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa [32] y dislipidemia caracterizada por hipertrigliceridemia, resistencia a la leptina, ácido úrico sérico alto y sin cambios en el colesterol sérico total [33]. A nivel renal se describen depósitos intersticiales de colágeno e infiltración de macrófagos, junto con la hiperplasia tubular proximal renal [34]. Dietas combinadas en concentraciones altas en carbohidratos –fructosa, sacarosa- y grasa, imitan mejor dietas humanas inductoras de síndrome metabólico en roedores. Diferentes combinaciones y cantidades de carbohidratos (entre 10 y 30%) y grasas (entre 20 y 40 %) se han utilizado en diferentes modelos animales [35-36], originando incremento del peso corporal, aumento de grasa abdominal, inflamación, hiperinsulinemia,

hipertrigliceridemia, hiperglucemia, hiperleptinemia, resistencia a la insulina y el incremento de ácidos grasos libres circulantes [37-40]; dado que las dietas altas en carbohidratos y lípidos generan en los roedores la mayoría de las complicaciones presentes en el síndrome metabólico humano; estos modelos son probablemente la mejor manera para estudiar la fisiopatología de las complicaciones renales ejercidas por una dieta hipercalórica.

En el entendimiento de la bioquímica y el comportamiento celular en el desarrollo del fallo renal inducido por los trastornos metabólicos, nuestro grupo ha desarrollado una dieta hipercalórica hipérglucida que genera dislipidemia, disglucemia y alteraciones bioquímicas e histológicas renales en modelos murinos. Al primer mes de la dieta inductora, la dislipidemia se caracteriza por la caída del colesterol de alta densidad (HDL) y elevación de triglicéridos (TG), y se acompaña de disglucemias agudas identificables por el incremento del área bajo la curva (ABC) de la tolerancia oral a la glucosa; estas alteraciones metabólicas inducen el incremento de la tasa de filtrado glomerular (TFG), además de hiperfunción tubular proximal (se observa hipertrofia pero no hiperplasia), glicación y esclerosis; estos cambios son adaptativos (hipertrofia con hiperabsorción) al no haber evidencia de glucosuria y albuminuria clínicamente significativa, no se observan modificaciones bioquímicas e histológicas significativas glomerulares.

En el curso temporal de exposición a la dieta, el grupo experimental desarrolla en el segundo mes un incremento significativo de lípidos totales y ácidos grasos libres, continúa la caída HDL y continua la hipertrigliceridemia; por su parte el estado disglucémico se hace evidente con la alteración de la glucosa en ayuno, y aparición de proteínas glicadas (fructosamina). Bajo dichos estímulos la compensación renal se hace evidente al caer la TFG sin cambios clínicamente relevantes de glucosa y albumina urinarias a pesar de observarse un incremento en la esclerosis y glicación tubular proximal; a nivel de la arquitectura glomerular se aprecia el inicio de hipertrofia y esclerosis en el penacho glomerular, pero no se observa glicación significativa de la estructura.

Al tercer mes de exposición a la dieta hipercalórica, la disglucemia se vuelve crónica, existe una mayor glicación proteica evidenciada por un incremento de fructosamina, se observa una disfunción de la acción periférica de la insulina y se presenta la hiperglicemia alterada en ayuno; la dislipidemia continúa con la elevación de lípidos totales, ácidos grasos libres e hipertrigliceridemia crónica y se mantiene la caída del colesterol HDL; la función renal evidencia disminución significativa de la TFG, la disfunción tubular y glomerular se hace evidente al

Referencias

1. Heber D. (2010). *Am J Clin Nutr*;91:280S–3S.
2. FAO. 2012c. *Food systems for better nutrition*. Rome, 2013.
3. Gutiérrez JP. Et al. (2012) *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales*. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
4. Siriwardhana N, et al. (2013). *J Nutr Biochem*;24:613–23.
5. Maria Eugenia Frigolet Vazquez-Vela, Nimbe Torres. (2008). *Archives of Medical Research* 39, 715 e 728.
6. Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N, Claycombe KJ. (2012). *Mol Aspects Med*;33:26–34.
7. Shu Wang. et al. (2014). *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 1–18.
8. Wenpeng Cui, et al. (2013). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013: 367040.
10. S. Lenzen, (2008).” *Diabetologia*, vol. 51, no. 2, pp. 216–226.
11. Y. K. Sinzato, P. H. O. Lima, K. E. de Campos, A. C. I. Kiss, M. V. C. Rudge, and D. C. Damascene. (2009). *Revista da Associacao Medica Brasileira*, vol. 55, no. 4, pp. 384–388.
12. K.Srinivasan,B.Viswanad,L.Asrat,C.L.Kaul,and P. Ramarao, (2005). *Pharmacological Research*, vol. 52, no. 4, pp. 313–320.
13. H. Chen, O. Charlat, L. A. Tartaglia et al., (1996.). *Cell*, vol. 84, no. 3, pp. 491–495.
14. Y. F. Dong, L. Liu, K. Kataoka et al., (2010). *Diabetologia*, vol. 53, no. 1, pp. 180–191.
15. M. S. Winzell, E. M. Wulff ,G.S.Olsen,P.Sauerberg,C.F. Gotfredsen, and B. Ahrén, (2010). *European Journal of Pharmacology*, vol. 626, no. 2-3, pp. 297–305.
16. M. Enser, (1972). *Biochemical Journal*, vol. 129, no. 2, pp. 447–453.
17. J. M. Friedman, R. L. Leibel, D. S. Siegel, J. Walsh, and N. Bahary, (1991). *Genomics*, vol. 11, no. 4, pp. 1054–1062.
18. P. U. Dubuc, (1976). *Metabolism*, vol. 25, no. 12, pp. 1567–1574
19. A. van den Bergh, A. Vanderper, P. Vangheluwe et al., (2008). *Cardiovascular Research*, vol. 77, no. 2, pp. 371–379.
20. H. J. Park, D. A. DiNatale, M.-Y. Chung et al., (2011). *Journal of Nutritional Biochemistry. J Nutr Biochem. Apr*;22(4):393-400
21. A. Scarda, C. Franzin, G. Milan et al., (2010). *International Journal of Obesity*, vol. 34, no. 8, pp. 1319–1327.
22. M. Mizuno, T. Sada, M. Kato, and H. Koike, (2002). *Hypertension Research*, vol. 23, no. 2, pp. 271–278.
23. L. Ferreira, E. Teixeira-de-Lemos, F. Pinto et al., (2010). *Mediators of Inflammation*, vol. 2010, Article ID 592760.

24. S. Schafer, H. L. Schmidts, M. Bleich, A. E. Busch, and W. Linz, (2004). *British Journal of Pharmacology*, vol. 143, no. 1, pp. 27–32.
25. K. Kawano, T. Hirashima, S. Mori, and T. Natori, (1994). *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 24, supplement, pp. S317–S320.
26. F. Massiera, P. Barbry, P. Guesnet et al., (2010). *Journal of Lipid Research*, vol. 51, no. 8, pp. 2352–2361.
27. K. L. Sweazea, M. Lekic, and B. R. Walker, (2010). *Nutrition & Metabolism*, vol. 7, article 48.
28. S. M. Kim, C. W. Rico, S. C. Lee, and M. Y. Kang, (2010). *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 47, no. 1, pp. 12–17.
29. R. Kobayasi, E. H. Akamine, A. P. Davel, M. A. M. Rodrigues, C. R. O. Carvalho, and L. V. Rossoni, (2010). *Journal of Hypertension*, vol. 28, no. 10, pp. 2111–2119.
30. N. Deji, S. Kume, S. I. Araki et al., (2009). *American Journal of Physiology*, vol. 296, no. 1, pp. F118–F126, 2009.
31. G. A. Bray, S. J. Nielsen, and B. M. Popkin, (2004). *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, no. 4, pp. 537–543.
32. L. T. Tran, V. G. Yuen, and J. H. McNeill, (2009). *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 332, no. 1-2, pp. 145–159.
33. T. Nakagawa, K. R. Tuttle, R. A. Short, and R. J. Johnson, (2005). *Nature clinical practice. Nephrology*, vol. 1, no. 2, pp. 80–86.
34. T. Nakayama, T. Kosugi, M. Gersch et al., (2010). *American Journal of Physiology*, vol. 298, no. 3, pp. F712–F720.
35. R. Buettner, K. G. Parhofer, M. Woenckhaus et al., (2006). *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 36, no. 3, pp. 485–501.
36. S. Panchal, H. Poudyal, A. Iyer et al., (2011). *Journal of Cardiovascular Pharmacology* May;57(5):610.
37. A. Lomba, F. I. Milagro, D. F. Garcia-Diaz, A. Marti, J. Campion, and J. A. Martinez, (2010). *Lipids in Health and Disease*, vol. 9, article 60.
38. M.-R. Chun, Y. J. Lee, K.-H. Kim et al., (2010). *Journal of Korean Medical Science*, vol. 25, no. 7, pp. 1053–1059.
39. T. Murase, T. Mizuno, T. Omachi et al., (2001). *Journal of Lipid Research*, vol. 42, no. 3, pp. 372–378.
40. P. I. Parekh, A. E. Petro, J. M. Tiller, M. N. Feinglos, and R. S. Surwit, (1998). *Metabolism*, vol. 47, no. 9, pp. 1089–1096.
41. A. Sato, H. Kawano, T. Notsu et al., (2010). *Diabetes*, vol. 59, no. 10, pp. 2495–2504.

Semblanza del M. en C. Ángel Flores



Egresado de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP en 1990 como Químico Farmacobiólogo. Tiene estudios de Maestría Ciencias de Laboratorio Clínico, otorgado por el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana y la BUAP. Su trabajo está enfocando a comprender la participación del impacto de las diferentes patologías humanas en el desarrollo de las alteraciones histológicas y bioquímicas de la función del árbol urinario. Es profesor de la Facultad de Ciencias

Químicas de la BUAP, imparte materias como Hematología, Química Clínica, Parasitología y Control Estadístico de la Calidad entre otras. Cuenta con publicaciones en revistas nacionales del área clínica; además de ser fundador de un Laboratorio Clínico en Tlaxcala y cofundador de otro en Puebla; es cofundador del Laboratorio de Investigaciones Nefrourológicas en la BAUP.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 175-196, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LA BOMBA DE CALCIO SERCA2 Y LA CALSECUESTRINA EN EL CORAZÓN: MECANISMOS TRANSCRIPCIONALES QUE REGULAN SU EXPRESIÓN

THE CALCIUM PUMP AND CALSEQUESTRIN IN THE HEART:
TRANSCRIPTIONAL MECHANISMS THAT REGULATES ITS EXPRESSION

Ángel Zarain-Herzberg, Jorge Fragoso-Medina, Rafael Estrada-Avilés y Gabriela Rodríguez

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad No. 3000, Coyoacán, 04510, México, D.F.

Resumen

El control de los niveles del ion calcio (Ca^{2+}) durante el ciclo de contracción y relajación del cardiomiocito es muy importante para la actividad contráctil del corazón normal. El retículo sarcoplásmico (RS) juega un papel clave en el control de la concentración citosólica de calcio. La ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA2a, por sus siglas en inglés: sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-2a), transporta Ca^{2+} al interior del RS durante la relajación del cardiomiocito. Dentro del RS de los cardiomiocitos, la calsecuestrina (CASQ2) es la principal proteína de unión a Ca^{2+} ya que amortigua la concentración de Ca^{2+} dentro del RS y ayuda a regular su liberación interactuando con el canal de liberación de Ca^{2+} sensible a rianodina

(RyR2). Las alteraciones en el manejo de la concentración citosólica de Ca^{2+} contribuyen significativamente a la disfunción contráctil observada en la hipertrofia y en la insuficiencia cardíaca. El estudio de la regulación transcripcional del gen *SERCA2* ha permitido dilucidar algunos de los mecanismos que regulan su expresión. En este trabajo se revisan los conocimientos actuales sobre la regulación transcripcional de los genes *SERCA2* y *CASQ2* en el corazón normal y patológico.

Palabras clave: retículo sarcoplásmico, ATPasa- Ca^{2+} , CASQ, hipertrofia cardíaca, disfunción contráctil

Abstract

The control of Ca^{2+} levels during the contraction/relaxation cycle in the cardiomyocyte is very important for normal heart contractility. The sarcoplasmic reticulum (SR) controls cytosolic calcium concentration. The SR Ca^{2+} -ATPase (*SERCA2a*) transports Ca^{2+} inside the SR lumen during cardiomyocyte relaxation. Calsequestrin (*CASQ2*) is the main protein inside the SR, functions as a Ca^{2+} buffer and participating in Ca^{2+} release by interacting with the ryanodine receptor-2 (RyR2) Ca^{2+} release channel. Alterations in normal Ca^{2+} handling significantly contribute to the contractile dysfunction observed in cardiac hypertrophy and in heart failure. Transcriptional regulation of the *SERCA2* gene has been extensively studied and some of the mechanisms regulating its expression have been elucidated. In this work we review the current knowledge regarding transcriptional regulation of *SERCA2* and *CASQ2* genes in the normal and pathologic heart.

Keywords: sarcoplasmic reticulum, Ca^{2+} -ATPase, CASQ, cardiac hypertrophy, contractile dysfunction

Introducción

El proceso de acoplamiento excitación-contracción (AEC) en los cardiomiocitos se lleva a cabo en una estructura especializada conocida como el túbulo T. El AEC inicia cuando un estímulo despolarizante alcanza a los canales de calcio tipo-L (dependientes de voltaje) del sarcolema también conocidos como receptores de dihidropiridinas (DHPR). Una vez activos, los canales de calcio tipo-L permiten la entrada de calcio libre (Ca^{2+}) desde el espacio extracelular hacia el sarcoplasma (ver **Figura 1**). El aumento en la concentración local de Ca^{2+} provoca la apertura de los canales de liberación de Ca^{2+} sensibles a rianodina (RyR2) del RS. Dicha apertura produce una liberación de Ca^{2+} rápida y masiva del interior del RS hacia el sarcoplasma. Esta secuencia de eventos causa el aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) desde ~ 100 nM hasta ~ 1 mM. Posteriormente, el Ca^{2+} se une al complejo de troponina-tropomiosina provocando un cambio conformacional que expone el sitio de unión a actina en la miosina, de este modo se forman puentes cruzados entre la actina y la miosina. Tras la formación de puentes cruzados hay una generación de fuerza por el movimiento del filamento de actina sobre el filamento de miosina y la liberación de difosfato de adenosina (ADP), por lo que se produce la contracción del cardiomiocito. Durante la relajación, la unión del trifosfato de adenosina (ATP) a las cadenas pesadas de la miosina (MHC) α y β produce el desprendimiento de la miosina de la actina. Para que se lleve a cabo la relajación del cardiomiocito, el Ca^{2+} liberado durante el AEC debe transportarse activamente desde el sarcoplasma hacia el interior del RS. La ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA2a, por sus siglas en inglés) se encarga de transportar nuevamente el Ca^{2+} hacia el interior del RS. En humanos, SERCA2a transporta alrededor del 60% del Ca^{2+} liberado durante el AEC mientras que en los roedores transporta hasta el 90%. El resto del Ca^{2+} se transporta al espacio extracelular principalmente por el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). La ATPasa de Ca^{2+} del sarcolema (PMCA) y el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) también contribuyen para preservar la homeostasis de Ca^{2+} en los cardiomiocitos [1,2].

Dentro del RS de los cardiomiocitos, el Ca^{2+} se une a la principal proteína de unión a Ca^{2+} , calsequestrina-2 (CASQ2) que tiene una alta capacidad de unión a Ca^{2+} (40 moles de Ca^{2+} /mol de proteína) y una moderada afinidad por Ca^{2+} ($K_d \sim 1$ mM). La principal función de CASQ2 es almacenar el Ca^{2+} necesario para el AEC. Sin embargo, CASQ2 también participa en la regulación de la liberación de Ca^{2+} por el canal RyR2 durante la contracción [3-8]. El control preciso de los niveles de Ca^{2+} durante el ciclo de contracción-relajación juega un papel clave para la función contráctil normal del cardiomiocito. La alteración en el manejo

normal del Ca^{2+} durante el AEC es la principal característica observada en la hipertrofia cardiaca patológica (HC) y en la insuficiencia cardiaca (IC) [1].

El Ca^{2+} también sirve como un mecanismo de señalización intracelular que acopla la excitación del sarcolema a funciones intracelulares. En el cardiomiocito, las variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ están implicadas en varias funciones de señalización, incluyendo la activación de la transcripción de genes [9]. Por lo tanto, es importante comprender la regulación de la expresión de las proteínas que participan en el transporte, unión y liberación de Ca^{2+} en los cardiomiocitos. En este trabajo se realiza una revisión acerca de la regulación transcripcional de los genes *SERCA2* y *CASQ2* en el corazón normal y patológico.

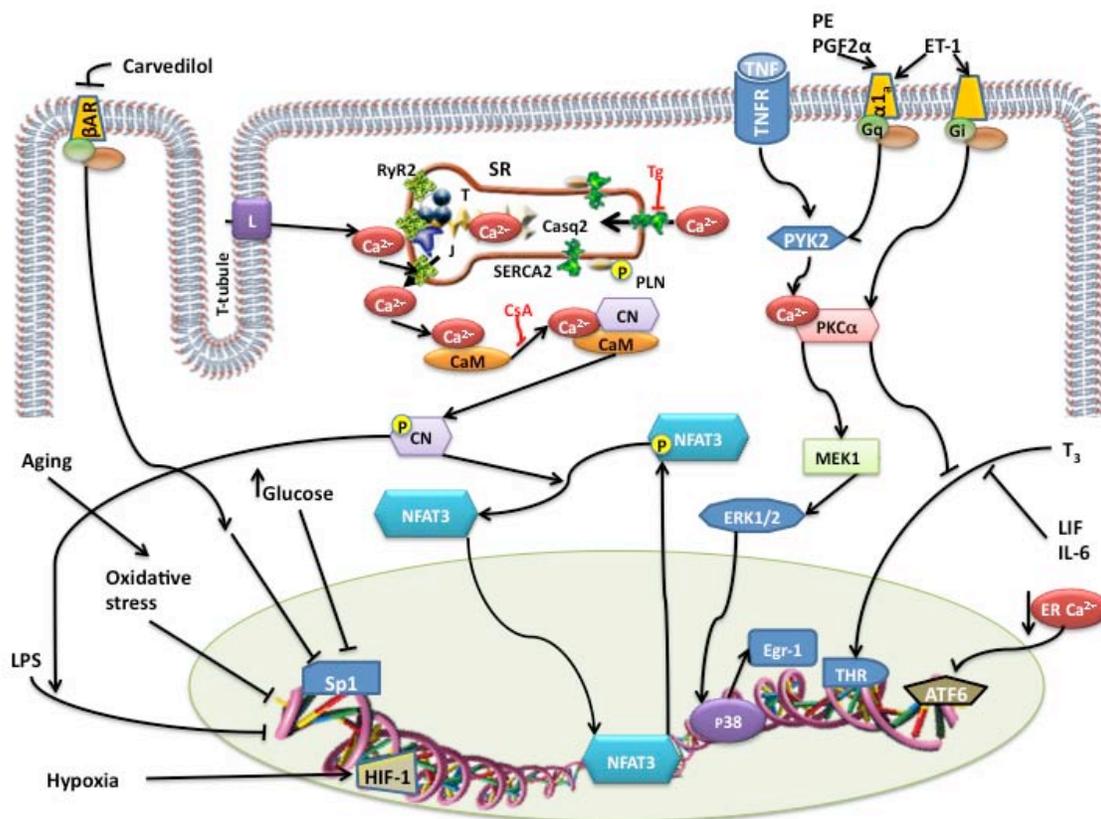


Figura 1. Vías de señalización propuestas en la regulación transcripcional del gen *SERCA2* en el corazón. Ver texto para explicación de las vías y para abreviaciones. Modificado de Zarain-Herzberg et al 2012 [10].

Alteraciones en el manejo del calcio en la hipertrofia e insuficiencia cardíacas.

La HC fisiológica, como la que se observa en los atletas, es resultado de una adaptación del corazón a una mayor demanda de trabajo. Por tanto se considera una modificación benigna del miocardio. Algunos de los cambios observados en la HC fisiológica son aumento en el tamaño del corazón, mejor funcionamiento cardíaco, aumento en la utilización de energía, y una expresión normal o aumentada de SERCA2a y de MHC- α . En contraste, en la HC patológica, el aumento en el tamaño del corazón está acompañado por una disminución en la función cardíaca, en la utilización de ácidos grasos, en la expresión del SERCA2a y MHC- α , y activación del programa de expresión de genes fetales cardíacos. En los estados iniciales de la HC patológica, se ha demostrado que la estimulación adrenérgica aumenta la expresión de SERCA2a. Sin embargo, si el estímulo patológico es continuo, la expresión del gen *SERCA2* disminuye como ocurre en la IC [11].

Los parámetros fisiológicos de contracción y relajación se encuentran alterados en los cardiomiocitos de corazones de animales con HC y en pacientes con IC [1,12]. Por ejemplo, se ha demostrado que una disminución en la velocidad de acortamiento de los cardiomiocitos durante la contracción se correlaciona con MHC miofibrilares con actividad reducida de ATPasa, así como con una disminución en la $[Ca^{2+}]_c$ [1,13-16]. Una disminución de la velocidad de remoción de Ca^{2+} del sarcoplasma por los cardiomiocitos durante la relajación miocárdica conduce a un aumento en los niveles de $[Ca^{2+}]_c$ durante la diástole, lo cual contribuye al desarrollo de la disfunción diastólica, al aumento de la presión ventricular al final de la diástole y a anomalías en el llenado ventricular que son características distintivas de la IC. En los cardiomiocitos de animales con HC y de corazones de pacientes con IC terminal, se observa una $[Ca^{2+}]_c$ disminuida durante la sístole y una velocidad reducida de transporte de Ca^{2+} hacia el RS por la bomba SERCA2a durante la diástole [12]. Una velocidad reducida de transporte de Ca^{2+} hacia el RS produce una reducción del contenido de Ca^{2+} del RS, lo cual produce una reducción de la cantidad de Ca^{2+} disponible para la contracción cardíaca y por tanto, una menor fuerza de contracción del miocardio. Por lo anterior, el bajo contenido de Ca^{2+} dentro del RS en los cardiomiocitos en la IC contribuye a la disminución en la contractilidad y la generación de fuerza del corazón en las cardiomiopatías [17,18].

El AEC es un proceso altamente coordinado y controlado por múltiples vías de señalización. La proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa II dependiente de

Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) actúan como sensores de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y son muy importantes en el control del AEC. Cambios en los niveles de expresión de estas proteínas reguladoras están entre las alteraciones observadas en la HC y en la IC [19]. Se ha demostrado un aumento en la expresión y en la actividad de CaMKII durante la IC, lo que influye drásticamente en la disminución de las propiedades contráctiles del corazón. El aumento de CaMKII puede alterar el AEC y conducir a muerte súbita [20]. Varios estudios han demostrado que la sobre-expresión de CaMKII en el corazón produce HC, IC y cardiomiopatía dilatada. En contraste, se han observado efectos protectores contra el desarrollo de IC en ratones “knock-out” para CaMKII. Entre las alteraciones producidas por la sobre-expresión de CaMKII están la disminución de los niveles de SERCA2a. La disminución en los niveles de SERCA2a reduce la recaptura de Ca^{2+} al interior del RS durante la diástole. Esto resulta en una menor cantidad de Ca^{2+} disponible para ser liberado en el siguiente latido cardiaco [21,22].

Fosfolamban (PLN), un péptido de 52 aminoácidos, está relacionado estrechamente con SERCA2a. En su estado nativo, PLN inhibe la actividad de SERCA2a. En respuesta a la estimulación de los receptores β -adrenérgicos, PLN es fosforilado por CaMKII o PKA, lo cual produce un aumento en la velocidad de transporte de Ca^{2+} de SERCA2a. La relación SERCA2a/PLN está reducida en la IC, debido en gran medida a la menor cantidad de bombas SERCA2a presentes en la membrana del RS. Esta reducción hace que la cantidad de SERCA2a disociada de PLN fosforilado disminuya. Por lo tanto, también disminuye la capacidad de recaptura del Ca^{2+} liberado durante la contracción [23]. La inhibición completa de SERCA2a requiere la asociación de PLN en pentámeros. El equilibrio entre la forma fosforilada de PLN (monómeros) y la defosforilada (pentámeros) determina el nivel de actividad de SERCA2a. Aunque hallazgos recientes sugieren que la activación de SERCA2a puede ocurrir sin la disociación del complejo SERCA2a/PLN, la disminución del nivel de PLN fosforilado sí disminuye la actividad de SERCA2a. Durante la IC, PLN está hipo-fosforilado. Esto causa una disminución crónica de la actividad de SERCA2a. Por lo tanto, la reducción en la actividad de SERCA2a también se debe a una alteración en el nivel de PLN fosforilado y no sólo a una menor expresión de SERCA2a. Por otro lado, un aumento de la actividad de PKC α , aumenta la fosforilación del inhibidor -1 (I-1) de la proteína fosfatasa-1 (PP1) en la Ser⁶⁷ [24], lo cual produce un aumento en la actividad de PP1 que ahora puede defosforilar a PLN. La defosforilación de PLN explica, en parte, la disminución en la actividad de SERCA2a observada en la IC. Por otro lado, cuando el canal RyR2 se disocia de la proteína calstabin, éste se vuelve inestable; un canal RyR2 inestable tiene una mayor probabilidad de

apertura lo cual implica la liberación espontánea de Ca^{2+} durante la diástole (fuga diastólica). La fuga diastólica se asocia con arritmias ventriculares y con una disminución de la reserva disponible de Ca^{2+} dentro del RS para la siguiente contracción [2,25].

La CaMKII comparte blancos funcionales comunes con PKA en la regulación del AEC. PLN y RyR2 son fosforilados tanto por PKA como por CaMKII. Esto produce un aumento en la liberación de Ca^{2+} por el RS. El aumento de la actividad de CaMKII en la IC contribuye a reducir el contenido de Ca^{2+} del RS, causa fuga diastólica de Ca^{2+} del RS y cambios de corrientes de Ca^{2+} que pueden ser arritmogénicos. Una de las principales causas de muerte súbita en pacientes con IC es la arritmia ventricular. Aunque la liberación anormal de Ca^{2+} del RS a través de RyR2 se ha relacionado con arritmogénesis, los mecanismos moleculares exactos se desconocen. Estudios recientes sugieren que la fosforilación de RyR2 por CaMKII está implicada en el aumento de la fuga diastólica de Ca^{2+} y también en la reducción de la carga de Ca^{2+} del RS en la IC. Lo anterior contribuye a la generación de arritmias y disfunción contráctil en la IC [26]. La fosforilación en la Ser²⁸¹⁴ de RyR2 catalizada por CaMKII tiene un papel dominante en la arritmogénesis y muerte súbita cardíaca en ratones con IC, lo que sugiere que la desestabilización de la actividad de RyR2 debida a su hiperfosforilación por CaMKII produce la reducción del periodo refractario. Este mecanismo está implicado comúnmente en la arritmogénesis y en la disfunción contráctil en el corazón con IC. Estos hallazgos podrían conducir al desarrollo de tratamientos farmacológicos más específicos que modifiquen el nivel de fosforilación de RyR2 por CaMKII. De este modo se reduciría la fuga diastólica de Ca^{2+} y la muerte por arritmias [27,28].

La sobrecarga de presión cardíaca observada en pacientes hipertensos es el principal estímulo patológico para el desarrollo de HC y el principal factor de riesgo para el desarrollo de IC. Durante la HC y la IC se han reportado alteraciones en las vías de señalización mediadas por Ca^{2+} . Se sabe que la expresión de SERCA2a está disminuida (hasta en un 50%) en la HC severa y en la IC. Considerando que la actividad de SERCA2a es esencial para el manejo del Ca^{2+} , es posible que la disminución en la expresión de SERCA2a se relacione con las alteraciones en las vías de señalización mediadas por Ca^{2+} observadas en la HC y la IC. Las dos principales vías de señalización mediadas por Ca^{2+} identificadas en los cardiomiocitos son la vía calcineurina (CN)-factor nuclear de células T activadas (NFAT, por sus siglas en inglés: nuclear factor of activated T-cells) y la vía CaMKII-desacetilasas de histonas-factor potenciador de miocitos 2 (por sus siglas en inglés: HDACs, histone deacetylases; MEF2, myocyte enhancer

factor 2). Ambas vías participan en el desarrollo normal del corazón y se alteran en la HC. Sin embargo, no está clara la forma en que se intercomunican y se regulan.

La inhibición específica de la actividad de SERCA2a con taspigargina (Tg), la reducción en la expresión del gen *SERCA2* por “knockdown” y el silenciamiento del gen *SERCA2* con siRNA producen fluctuaciones de señalización por Ca^{2+} y alteraciones de la función contráctil. [29].

Regulación transcripcional del gen *SERCA2*

El gen humano *SERCA2* se encuentra en el cromosoma 12q24.1. Contiene 23 exones que por empalme alternativo del RNA pre-mensajero producen 3 isoformas llamadas SERCA2a, b y c. En cardiomiocitos sólo se expresa la isoforma SERCA2a. La región reguladora proximal del gen *SERCA2* (225 pb) es muy rica en guaninas y citosinas y está conservada entre diferentes especies. Contiene una caja TATA, un elemento de respuesta a estrés del retículo endoplásmico (ERSE), sitios de unión para Egr-1, AP-2, Sp1, y 3 elementos de unión a receptores de hormona tiroidea (TRE). Hay otras dos regiones reguladoras conservadas situadas entre las posiciones -410 a -661 pb y -919 a -1410 pb [30]. Estas dos regiones conservadas contienen elementos putativos de unión para los factores de transcripción GATA-4, Nkx-2.5/Csx, OTF-1, USF, MEF-2, SRF, PPAR/RXR y AP-2 entre otros. Por arriba de -1,5 kb no hay una homología entre los genes *SERCA2* de diferentes especies. Lo anterior sugiere que la región reguladora del gen está contenida dentro de las primeras 2 kb [30]. De particular relevancia es el hallazgo de que los factores Sp1 y Sp3 regulan la transcripción del gen *SERCA2* en cardiomiocitos [31,32].

Regulación por hormonas

Varios grupos han investigado extensamente el efecto de la 3,3',5-triyodo-L-tironina (T_3) en la función del corazón y en la expresión de SERCA2a [33]. T_3 aumenta la expresión de SERCA2a mediante su unión a receptores nucleares (THR). Los elementos de respuesta a T_3 (TRE) consisten en dos repeticiones de 6 pb separadas por un espacio de 4 pb, ya sea como palíndromos directos o invertidos. Los THRs están codificados por dos genes diferentes THR- α y THR- β , y se producen diferentes isoformas del receptor mediante corte y empalme alternativo [34].

La T_3 aumenta la velocidad de relajación diastólica en el corazón debido en parte al aumento de SERCA2a [35,36] mientras que los corazones hipertiroideos presentan una elevada expresión de SERCA2a. Por el contrario, en corazones hipotiroideos la expresión de SERCA2a está disminuida y la administración de T_3 a los corazones de ratas con hipotiroidismo aumenta los niveles de SERCA2. Se ha demostrado que el aumento de la transcripción del gen *SERCA2* por T_3 está mediada por la unión de THR- α 1 y/o THR- β 1 a una región que contiene 3 TREs situados en el promotor proximal del gen [37,38]. La mutagénesis de uno de los sitios de unión a THR del gen *SERCA2* de conejo resulta en la pérdida del efecto de T_3 en su activación transcripcional. Además, T_3 es capaz de regular la expresión de PLN de forma opuesta a lo observado para SERCA2a [35]. En los corazones con hipotiroidismo, los niveles de PLN se incrementan con la consiguiente inhibición de la actividad de SERCA2a [34].

La norepinefrina (NE) es un agonista α 1-adrenérgico. A diferencia de T_3 , NE reduce la expresión de SERCA2a. El efecto de la NE en la expresión de SERCA2a depende de la contractibilidad cardiaca. En cardiomiocitos que no se contraen, la expresión de SERCA2a no se ve afectada cuando son expuestos a T_3 . Contrariamente, T_3 aumenta la expresión de SERCA2a en las mismas condiciones [39]. En condiciones patológicas, PE inhibe el aumento de SERCA2a inducido por T_3 . Se ha demostrado que este efecto es mediado directamente por la estimulación α 1 -adrenérgica a través una proteína G constitutivamente activa (Gq). Es posible que la disminución en la expresión de SERCA2a, sea mediada transcripcionalmente [40].

En la IC terminal se ha observado un incremento de la proteína co-represora FOG-2 (Friend of GATA-2, por sus siglas en inglés). El aumento de FOG-2 bloquea el aumento de la expresión del gen *SERCA2* inducido por T_3 . Esto representa un nuevo mecanismo de resistencia del corazón a esta hormona [41].

Una familia de hormonas críticas en la función cardiaca es el grupo de diferentes vasoconstrictores como la angiotensina-II (Ang-II), la endotelina-1 (ET-1) y la prostaglandina-F₂ (PGF₂). El efecto supresor de la ET-1 sobre la expresión de *SERCA2* requiere comunicación entre las vías mediadas por Gq y Gi sensible a la toxina pertussis [42]. Además, se ha observado que la señalización por PKC es necesaria para la represión de *SERCA2* mediada por ET-1 [43,44]. Es importante hacer notar que la señalización por PKC es suficiente para inducir la represión de *SERCA2* [45] y que probablemente sea específica para ciertas isoenzimas de PKC [46]. Por otra parte, la hipertrofia de cardiomiocitos neonatales y la represión de *SERCA2* provocadas por PE, se evita mediante la inhibición de

PKC con Gö6983 [47]. La Ang-II es otro vasoconstrictor cuya acción en la transcripción del gen *SERCA2* es perjudicial en los cardiomiocitos neonatales pero no en los adultos [48]. El mismo comportamiento se produce en cardiomiocitos adultos de rata tratados con PE que muestran un incremento en la transcripción del gen *SERCA2* [49].

La concentración de hormona paratiroidea (PTH) es mayor en el plasma de pacientes con enfermedades cardiacas que en individuos sanos. De hecho, una forma sintética de la proteína relacionada con la hormona PTH (PTHrP) es capaz de inducir hipertrofia en cardiomiocitos. La hipertrofia cardiaca puede ser prevenida por una forma truncada de PTHrP [50] mientras que *SERCA2* se regula positivamente por una forma de PTHrP sintética que carece de los primeros 6 aminoácidos N-terminales. Por lo tanto, surge la posibilidad de una doble función para la PTHrP como se observa también para los THR α s [41].

PGF $_2$ es un vasoconstrictor que también participa en la respuesta inflamatoria que se produce en el miocardio posterior a un infarto o por sobrecarga de presión cardiaca [51-53]. Se ha demostrado que PGF $_2$ estimula el crecimiento hipertrófico de cardiomiocitos de ratas neonatas y reduce la expresión de *SERCA2a*. PGF $_2$ incrementa la expresión de Egr-1, mientras que la sobreexpresión de este factor transcripcional disminuye la transcripción de un plásmido reportero que contiene el promotor proximal del gen *SERCA2* y en el que existe un sitio putativo de unión a Egr-1. El efecto represivo que ejerce PGF $_2$ sobre la transcripción de *SERCA2* a través del factor de transcripción Egr-1 está mediado por p38/MAPK, Ras y Rac pero no por ERK [54].

La concentración del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y de interleucina-6 (IL-6) se incrementan en el plasma de pacientes con insuficiencia cardiaca diastólica y se ha propuesto que TNF- α e IL-6 reducen la expresión de *SERCA2* [55,56]. El tratamiento con el factor inhibidor de leucemia (LIF) o IL-6 reduce el aumento en el RNAm de *SERCA2* inducido por T $_3$. Estos datos sugieren que los efectos inhibitorios mediados por citocinas en el promotor del gen *SERCA2* pueden deberse a que interfieren con la acción de T $_3$ [55]. En células HL-1 se encontró que TNF- α reprime la expresión de *SERCA2a* y que esto podría deberse al aumento en la metilación del promotor del gen *SERCA2* [57]. Asimismo, en células H9c2 y en el corazón embrionario de rata, la exposición al solvente tricloroetileno produjo una hipermetilación del promotor del gen *SERCA2* y una disminución en la concentración de S-adenosil-metionina [58]. Una de las proteínas implicadas en la vía de señalización de TNF- α es PYK2. PYK2 es una proteína de andamiaje que transduce señales de receptores acoplados a proteínas

G a la señalización por MAP cinasas (MAPK) [59,60]. Se reportó que PYK2 reprime la expresión del gen *SERCA2* a través de la fosforilación de JNK1/2 y p38-MAPK [61]. Esto refuerza otros datos que demuestran la importancia de TNF- α , p38-MAPK y PKC en la regulación transcripcional de *SERCA2* [45,54,57].

Regulación por hipoxia e isquemia

La $[Ca^{2+}]_c$ es un regulador clave de la lesión provocada por isquemia-reperfusión. Durante la enfermedad isquémica cardiaca y en el miocardio hipóxico la expresión de *SERCA2a* se encuentra disminuida, lo que se asocia a disfunción contráctil [62]. En cardiomiocitos en cultivo sometidos a hipoxia la transcripción de *SERCA2* está disminuida [63]. La activación del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) o la sobreexpresión del factor estable a normoxia HIF-1 α (HIF-1 α /VP16) disminuyó tanto la expresión del RNAm de *SERCA2a* como la actividad de unión de dos elementos funcionales HIF-1 presentes en el promotor del gen *SERCA2*. Estos resultados pueden explicar la disminución de la actividad de *SERCA2a* observada en el miocardio isquémico e hipóxico y probablemente establecer un vínculo entre el suministro de oxígeno y las $[Ca^{2+}]_c$. De acuerdo con la observación anterior, se ha reportado que el ejercicio mejora el manejo de Ca^{2+} y la función de *SERCA2a* [64]. También se ha encontrado que los factores de transcripción mitocondrial TFAM y TFB2M regulan la transcripción del gen *SERCA2* en cardiomiocitos, proporcionando un vínculo entre la producción de ATP mitocondrial y el gasto de ATP por *SERCA2a* [65].

Regulación por las vías de señalización mediadas por calcio

Las vías de señalización de la CN y la CaMKII desempeñan un papel clave en la regulación de la expresión de *SERCA2* en cardiomiocitos como lo evidencia el hecho de que el aumento en la expresión de *SERCA2* provocado por la inhibición de la contractilidad es parcialmente evitado cuando se bloquea alguna de las 2 vías [66]. Los aumentos sostenidos en la $[Ca^{2+}]_c$ activan la vía CN-NFAT. Esta vía se ha propuesto como un regulador primario de la expresión de *SERCA2*. El tratamiento de cardiomiocitos con taspigargina (Tg, inhibidor específico de *SERCA2*) aumentó la concentración citosólica de Ca^{2+} . Este aumento del Ca^{2+} citosólico aumentó los niveles de RNAm de *SERCA2* mientras que la inhibición de la actividad de CN lo previno [29]. Hallazgos recientes demuestran que la participación simultánea de la vía CN-NFAT y de otras vías de señalización

activadas por Ca^{2+} podrían explicar la reducción de la expresión de SERCA2a en HC, a pesar de la actividad elevada de CN que se observa en esa patología [47].

La regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es crucial para el apropiado funcionamiento celular. En el interior del retículo endoplásmico (RE) la concentración de Ca^{2+} debe ser mantenida dentro de cierto rango. Si la concentración de Ca^{2+} dentro del RE baja, se activa la respuesta a estrés del RE [67]. Cuando se activa la respuesta a estrés del RE, el factor transcripcional ATF6 se libera del RE. Posteriormente, ATF6 se transloca al núcleo donde promueve la transcripción de varios genes incluyendo *SERCA2* [68]. Por otra parte, ATF6 es capaz de inducir la transcripción del regulador de la calcineurina-1 (RCAN1). Por lo tanto, ATF6 controla al mismo tiempo la transcripción de *SERCA2* y de uno de sus reguladores [69].

Debido al papel clave de SERCA2a en la función cardíaca, múltiples vías de señalización regulan su expresión. Entre ellas está la vía MAPK. Se ha demostrado que la vía MAPK regula directa e indirecta la vía CN-NFAT. A su vez, CN-NFAT regula la transcripción de *SERCA2* durante la HC [70]. Aunque menos explorada en este contexto, la respuesta inflamatoria también está involucrada en la HC y posiblemente en la expresión de SERCA2a. Se ha demostrado que el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas induce características hipertróficas en células H9c2, lo que puede ser evitado si se inhibe la actividad de CN [71].

La transcripción y función de SERCA2a se pueden modificar indirectamente por muchos factores como la función y/o expresión de otras proteínas que manejan calcio y que pueden interactuar con SERCA2a [72]. Además, el proceso de envejecimiento disminuye la función enzimática y la expresión de SERCA2a [73-75]. Por otro lado, el estrés oxidante reprime la transcripción y la función de SERCA2a [76]. Se han propuesto estrategias para restaurar el estado redox y atenuar la disminución de la función del corazón producida por el estrés oxidante [77]. De hecho, los efectos benéficos del carvedilol, un bloqueador β -adrenérgico están relacionados con la restauración de la expresión de SERCA2 en pacientes con IC. La disminución de SERCA2 inducida por el estrés oxidante es prevenida por el carvedilol al promover la unión de Sp1 y Sp3 a sus elementos de unión situados en el promotor proximal del gen [78].

Debido al alto consumo de energía que requieren los ciclos de contracción-relajación, la desregulación del equilibrio energético juega un papel sustancial en la disfunción del ventrículo izquierdo. Por ejemplo, ratones con “knock-out”

específico para cardiomiocitos del receptor de la insulina, muestran mayor disfunción mitocondrial posterior a un infarto del miocardio. Esta alteración va acompañada de la disminución de varias proteínas incluyendo SERCA2a, PPAR- y GLUT4 [79]. Los ratones “knock-out” del transportador de glucosa GLUT4 presentan un desempeño contráctil deficiente, hipertrofia de cardiomiocitos, fibrosis y expresión reducida de las proteínas RyR2 y SERCA2a [80]. Dado que la diabetes es una causa muy frecuente de cardiomiopatía, varios estudios han abordado la expresión de SERCA2 en el contexto de la diabetes. Por lo tanto, se remite al lector a otras revisiones para una discusión más profunda del tema [81,82].

Regulación transcripcional del gen CASQ2

En los cardiomiocitos, CASQ2 es la principal proteína de unión a Ca^{2+} dentro de las cisternas terminales del RS. CASQ2 es una proteína altamente ácida, debido a su porción C-terminal, dicha acidez proporciona la capacidad a CASQ2 de unir altas cantidades de Ca^{2+} [3]. A concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} dentro del RS, CASQ2 se polimeriza y se asocia con las proteínas transmembranales triadina (T) y junctina (J), formando un complejo regulador del canal RyR2 [4,6]. La concentración total de Ca^{2+} intraluminal varía significativamente entre los ciclos de contracción y relajación cardiacos, sin embargo, el complejo CASQ2-T-J mantiene amortiguados los niveles de Ca^{2+} libre en el RS en alrededor de 1 mM [4]. Como resultado de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} durante el AEC del cardiomiocito, se reducen los niveles de Ca^{2+} en el RS y cuando la concentración de Ca^{2+} dentro del RS alcanza un nivel crítico, el complejo CASQ2-T-J inhibe al canal RyR2. Posteriormente, cuando la bomba de Ca^{2+} SERCA2a restablece la carga de Ca^{2+} del RS, CASQ2 se disocia de T y J. Esto produce que el canal RyR2 se libere de la inhibición ejercida por CASQ2 [5].

En mamíferos, hay dos isoformas de CASQ codificadas por dos genes diferentes (CASQ1 y CASQ2). Ambas isoformas se expresan exclusivamente en células musculares [83]. En humanos, la isoforma CASQ1 está codificada por el gen CASQ1 localizado en el cromosoma 1q21. CASQ1 se expresa tanto en el músculo esquelético de contracción rápida como en el músculo esquelético de contracción lenta. La isoforma CASQ2 está codificada por el gen CASQ2 situado en el cromosoma 1p11-13.3. CASQ2 se expresa principalmente en el músculo cardiaco y en el músculo esquelético de contracción lenta. En el músculo de contracción lenta aproximadamente un 25% del total de CASQ corresponde a la isoforma CASQ2. El 75% restante corresponde a la isoforma CASQ1. Durante el

desarrollo fetal, CASQ2 es la única isoforma expresada en cardiomiocitos. Este patrón se mantiene sin cambios durante el periodo posterior al parto y también en la edad adulta. En músculo esquelético, el gen CASQ2 se expresa durante el desarrollo de los músculos de contracción rápida y de contracción lenta. Sin embargo, durante el periodo posterior al parto únicamente se expresa la isoforma CASQ1. De este modo, CASQ1 es la única isoforma expresada en el músculo esquelético de contracción rápida adulto [83,84].

Los niveles de RNAm de CASQ2 se han medido en estados patológicos como la HC, la IC y la cardiomiopatía dilatada. Sin embargo, no se ha encontrado alteración alguna [85]. En ratones que sobre-expresan CASQ2 se encontró HC, inducción de un programa fetal de expresión génica cardíaca, reducción en la fracción de acortamiento del cardiomiocito, aumento en la capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} del RS, disminución de la liberación de Ca^{2+} del RS y un deterioro en la función contráctil [86]. Contrariamente, la ablación del gen CASQ2 produce un fenotipo arritmico sin alteraciones de la función contráctil. Cuando la CASQ2 está ausente, hay una mayor probabilidad de liberación espontánea de Ca^{2+} del RS [87]. Estos datos proporcionan un mecanismo fisiopatológico para la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT, por sus siglas en inglés). En este trastorno se encuentran varias mutaciones en el gen humano CASQ2 que producen una proteína con una función defectuosa. La CPVT es un síndrome hereditario raro caracterizado por taquiarritmias ventriculares inducidas por el estrés adrenérgico sin cambios estructurales del corazón [88]. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que CASQ2 es una proteína central en el control de la homeostasis del Ca^{2+} en el miocardio.

Las hormonas tiroideas tiene una profunda influencia en la expresión de muchas proteínas que controlan la homeostasis de Ca^{2+} , tales como SERCA2a, PLN, NCX y CASQ2. En ratas de la cepa Lewis inducidas a ser hipotiroideas con el compuesto metimazol, los niveles de CASQ1 están disminuidos en el músculo EDL. Esta reducción puede deberse a que en el hipotiroidismo hay una disminución en la proporción de fibras musculares 2B rápidas que expresan CASQ1. Al contrario, el tratamiento con T_3 aumentó los niveles de CASQ1 en el músculo EDL. Esto puede deberse a que T_3 aumenta la proporción de fibras musculares 2B rápidas que expresan CASQ1. Estudios adicionales deben realizarse para explicar el papel de las hormonas tiroideas en la regulación de la expresión de CASQ1 y CASQ2 [89].

A pesar de la importancia de CASQ2 en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas, el control transcripcional del gen CASQ2 aún es poco conocido. El

análisis *in silico* del promotor del gen humano *CASQ2* reveló que la región entre -130 y -30 pb respecto al sitio de inicio de transcripción está altamente conservada entre especies. En esta región hay sitios de unión para los factores de transcripción MEF-2 y SRF. Mediante ensayos funcionales y mutagénesis dirigida, se demostró que estos sitios son importantes para la transcripción del gen *CASQ2* en cardiomiocitos [84]. La sobre-expresión de Egr-1 en células H9c2 disminuye la expresión de *CASQ2*. Por lo tanto, el factor de transcripción Egr-1 podría ser un regulador negativo de la expresión de *CASQ2*. Por otro lado, el tratamiento de las células H9c2 con ciclosporina A (un inhibidor de la vía Ca^{2+} -CaM-CN/NFAT) disminuyó la expresión de *CASQ2* [90]. Existen sitios putativos de unión al factor de transcripción NFAT, tanto en el gen *CASQ2* de la rata como en el gen *CASQ2* humano [84,90]. Tomados en conjunto, estos datos sugieren un papel de la vía Ca^{2+} -CaM-CN/NFAT en la regulación del gen *CASQ2*. (Figura 2).

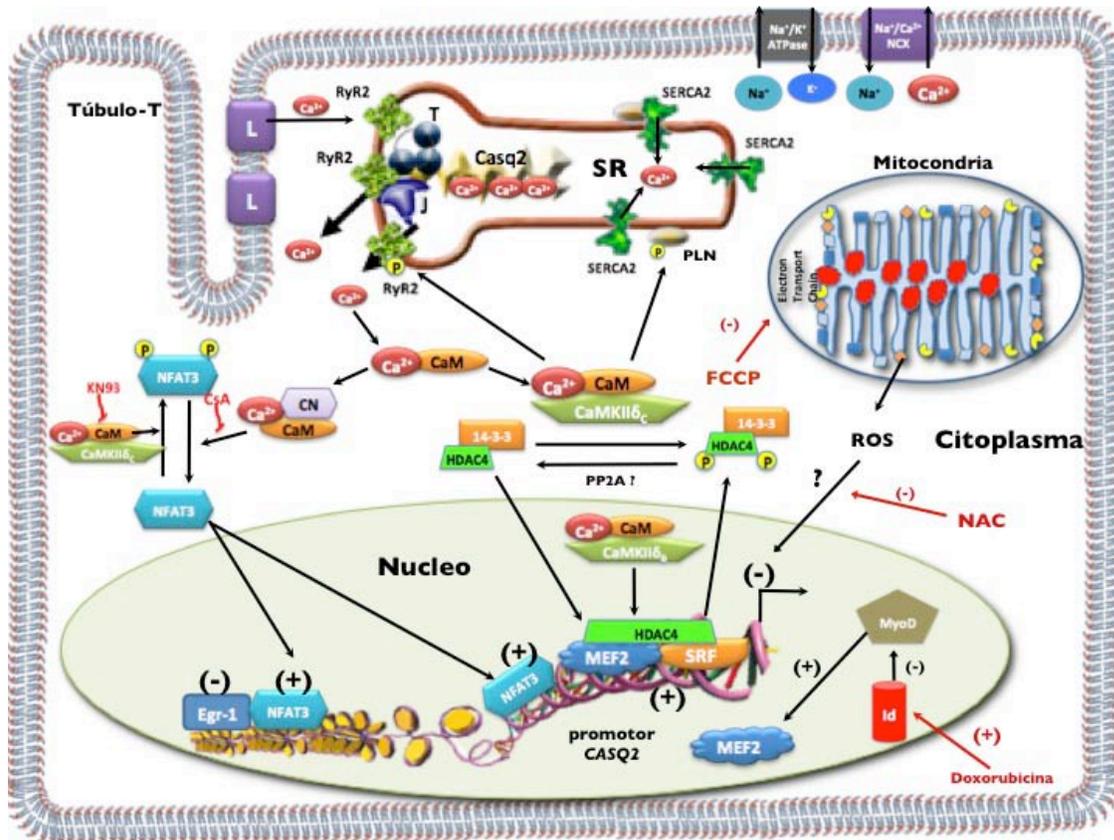


Figura 2. Regulación transcripcional propuesta del gen *CASQ2* en cardiomiocitos. Ver texto para explicación de las vías y para abreviaciones. Modificado de Zarain-Herzberg et al 2012) [10].

En patologías cardiacas con alteraciones en el manejo de Ca^{2+} como la HC y la IC, no se han reportado cambios en la expresión de CASQ2. Asimismo se han reportado alteraciones en las vías de CN y CaMKII en la HC y en la IC. Se sabe que estas vías activan a los factores de transcripción MEF-2, NFAT y SRF. Considerando que MEF-2 y SRF son importantes reguladores de la expresión de CASQ2, resulta interesante la ausencia de cambios en la expresión de CASQ2 en HC y en la IC [85]. Contrario a reportes previos, en un modelo de cardiomiopatía inducida por doxorubicina en conejos, se encontró una reducción en el nivel de RNAm de CASQ2. En dicho estudio, la expresión de otras proteínas implicadas en el control de la homeostasis del Ca^{2+} (RyR2, SERCA2 y PLN) también se encontró disminuida [91]. La doxorubicina es capaz de inhibir la expresión de genes controlados por MyoD al aumentar la expresión de su regulador, el factor Id. Lo anterior provoca la inhibición de la transcripción dependiente de MyoD [92]. Estos resultados son interesantes porque la expresión de MEF-2 depende de la actividad de MyoD. Teniendo en cuenta el papel de MEF-2 en la expresión del gen CASQ2, esto podría proporcionar la base molecular para el bajo nivel de RNAm de CASQ2 inducido por doxorubicina. El análisis de la secuencia de la región reguladora del gen CASQ2 reveló varios sitios putativos de unión a MyoD [84]. Por lo tanto, la inducción del factor Id por doxorubicina también puede tener un impacto directo en la expresión del gen CASQ2

Finalmente, un reporte reciente sugiere que el estrés oxidante puede tener un papel en la expresión del gen CASQ2. Cardiomiocitos de rata en cultivo, fueron tratados con el agente desacoplante mitocondrial carbonil-cianuro-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP). El tratamiento con FCCP disminuyó los niveles de RNAm de CASQ2. Por otro lado, el tratamiento de cardiomiocitos con el antioxidante N-acetil-cisteína previno la disminución del RNAm de CASQ2 inducida por FCCP [93]. Sin embargo, el mecanismo molecular de este efecto permanece desconocido. Es evidente que el control transcripcional del gen CASQ2 es más complejo de lo que se reportó anteriormente [84] y muchas vías dependientes e independientes de Ca^{2+} pueden participar en su regulación. Teniendo en cuenta el papel central de CASQ2 en la liberación de Ca^{2+} del RS en el músculo cardiaco y su implicación en las patologías cardiacas tales como la CPVT y la cardiomiopatía inducida por doxorubicina, es importante estudiar a detalle la regulación de la expresión del gen CASQ2

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por DGAPA-PAPIIT IN204410 y CONACYT 164413.

Referencias

1. Bers, D. M. (2002) *Nature* **415**, 198-205
2. Bers, D. M. (2008) *Annu Rev Physiol* **70**, 23-49
3. Beard, N. A., Laver, D. R., and Dulhunty, A. F. (2004) *Prog Biophys Mol Biol* **85**, 33-69
4. Beard, N. A., Wei, L., and Dulhunty, A. F. (2009) *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 340-345
5. Gyorke, S., Stevens, S. C., and Terentyev, D. (2009) *J Physiol* **587**, 3091-3094
6. Lee, K. W., Maeng, J. S., Choi, J. Y., Lee, Y. R., Hwang, C. Y., Park, S. S., Park, H. K., Chung, B. H., Lee, S. G., Kim, Y. S., Jeon, H., Eom, S. H., Kang, C., Kim do, H., and Kwon, K. S. (2012) *J Biol Chem* **287**, 1679-1687
7. MacLennan, D. H., and Chen, S. R. (2009) *J Physiol* **587**, 3113-3115
8. Yano, K., and Zarain-Herzberg, A. (1994) *Molecular and cellular biochemistry* **135**, 61-70
9. Bers, D. M. (2008) *Annu Rev Physiol* **70**, 23-49
10. Zarain-Herzberg, A., Estrada-Aviles, R., and Fragoso-Medina, J. (2012) *Can J Physiol Pharmacol* **90**, 1017-1028
11. Arai, M., Suzuki, T., and Nagai, R. (1996) *J Mol Cell Cardiol* **28**, 1583-1590
12. Reyes-Juarez, J. L., and Zarain-Herzberg, A. (2006) *Arch Cardiol Mex* **76 Suppl 4**, S18-32
13. Alpert, N. R., Brosseau, C., Federico, A., Krenz, M., Robbins, J., and Warshaw, D. M. (2002) *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **283**, H1446-1454
14. Baker, A. J., Figueredo, V. M., Keung, E. C., and Camacho, S. A. (1998) *The American journal of physiology* **275**, H744-750
15. Palmer, S., and Kentish, J. C. (1998) *Circulation research* **83**, 179-186
16. Vannier, C., Chevassus, H., and Vassort, G. (1996) *Cardiovascular research* **32**, 580-586
17. Bassani, J. W., Qi, M., Samarel, A. M., and Bers, D. M. (1994) *Circulation research* **74**, 991-997
18. Teucher, N., Prestle, J., Seidler, T., Currie, S., Elliott, E. B., Reynolds, D. F., Schott, P., Wagner, S., Kogler, H., Inesi, G., Bers, D. M., Hasenfuss, G., and Smith, G. L. (2004) *Circulation* **110**, 3553-3559
19. Kaprielian, R., del Monte, F., and Hajjar, R. J. (2002) *Basic research in cardiology* **97 Suppl 1**, I136-145
20. Soltis, A. R., and Saucerman, J. J. (2010) *Biophys J* **99**, 2038-2047

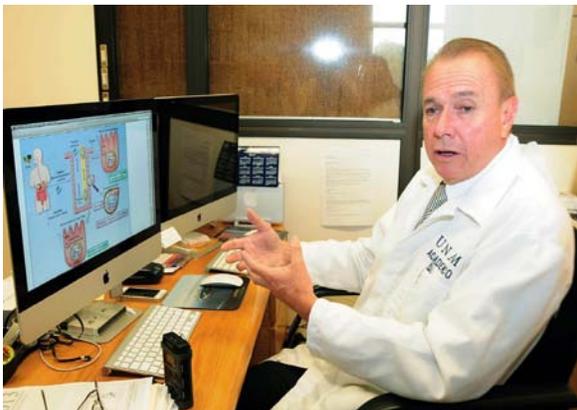
21. Zhang, T., Johnson, E. N., Gu, Y., Morissette, M. R., Sah, V. P., Gigena, M. S., Belke, D. D., Dillmann, W. H., Rogers, T. B., Schulman, H., Ross, J., Jr., and Brown, J. H. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**, 1261-1267
22. Backs, J., Backs, T., Neef, S., Kreusser, M. M., Lehmann, L. H., Patrick, D. M., Grueter, C. E., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J. A., Katus, H. A., Bassel-Duby, R., Maier, L. S., and Olson, E. N. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2342-2347
23. Hoshijima, M., Knoll, R., Pashmforoush, M., and Chien, K. (2006) *J Am Coll Cardiol* **48**, A15-23
24. Braz, J. C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., Nairn, A. C., Liggett, S. B., Bodi, I., Wang, S., Schwartz, A., Lakatta, E. G., DePaoli-Roach, A. A., Robbins, J., Hewett, T. E., Bibb, J. A., Westfall, M. V., Kranias, E. G., and Molckentin, J. D. (2004) *Nat Med* **10**, 248-254
25. Braunwald, E., and Bristow, M. R. (2000) *Circulation* **102**, IV14-23
26. Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M., and Pogwizd, S. M. (2005) *Circulation research* **97**, 1314-1322
27. Belevych, A. E., Terentyev, D., Terentyeva, R., Nishijima, Y., Sridhar, A., Hamlin, R. L., Carnes, C. A., and Gyorke, S. (2011) *Cardiovascular research* **90**, 493-502
28. van Oort, R. J., McCauley, M. D., Dixit, S. S., Pereira, L., Yang, Y., Respress, J. L., Wang, Q., De Almeida, A. C., Skapura, D. G., Anderson, M. E., Bers, D. M., and Wehrens, X. H. (2010) *Circulation* **122**, 2669-2679
29. Prasad, A. M., and Inesi, G. (2011) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H173-180
30. Zarain-Herzberg, A., and Alvarez-Fernandez, G. (2002) *ScientificWorldJournal* **2**, 1469-1483
31. Brady, M., Koban, M. U., Dellow, K. A., Yacoub, M., Boheler, K. R., and Fuller, S. J. (2003) *Cardiovasc Res* **60**, 347-354
32. Takizawa, T., Arai, M., Tomaru, K., Koitabashi, N., Baker, D. L., Periasamy, M., and Kurabayashi, M. (2003) *Journal of molecular and cellular cardiology* **35**, 777-783
33. Kahaly, G. J., and Dillmann, W. H. (2005) *Endocr Rev* **26**, 704-728
34. Dillmann, W. (2010) *Heart Fail Rev* **15**, 125-132
35. Nagai, R., Zarain-Herzberg, A., Brandl, C. J., Fujii, J., Tada, M., MacLennan, D. H., Alpert, N. R., and Periasamy, M. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2966-2970
36. Rohrer, D., and Dillmann, W. H. (1988) *J Biol Chem* **263**, 6941-6944
37. Hartong, R., Wang, N., Kurokawa, R., Lazar, M. A., Glass, C. K., Apriletti, J. W., and Dillmann, W. H. (1994) *J Biol Chem* **269**, 13021-13029
38. Zarain-Herzberg, A., Marques, J., Sukovich, D., and Periasamy, M. (1994) *J Biol Chem* **269**, 1460-1467
39. Muller, A., Zuidwijk, M. J., Simonides, W. S., and van Hardeveld, C. (1997) *The American journal of physiology* **272**, H1876-1885

40. Wu, P. S., Moriscot, A. S., Knowlton, K. U., Hilal-Dandan, R., He, H., and Dillmann, W. H. (1997) *Endocrinology* **138**, 114-120
41. Rouf, R., Greytak, S., Wooten, E. C., Wu, J., Boltax, J., Picard, M., Svensson, E. C., Dillmann, W. H., Patten, R. D., and Huggins, G. S. (2008) *Circulation research* **103**, 493-501
42. Hilal-Dandan, R., He, H., Martin, J. L., Brunton, L. L., and Dillmann, W. H. (2009) *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **296**, H728-734
43. Uehara, Y., Azuma, Y., Minai, K., Yoshida, H., Yoshimura, M., and Shimizu, M. (2012) *Heart Vessels* **27**, 98-105
44. Uehara, Y., Azuma, Y., Minai, K., Yoshida, H., Yoshimura, M., and Shimizu, M. (2011) *Heart Vessels*
45. Hartong, R., Villarreal, F. J., Giordano, F., Hilal-Dandan, R., McDonough, P. M., and Dillmann, W. H. (1996) *Journal of molecular and cellular cardiology* **28**, 2467-2477
46. Porter, M. J., Heidkamp, M. C., Scully, B. T., Patel, N., Martin, J. L., and Samarel, A. M. (2003) *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C39-47
47. Prasad, A. M., and Inesi, G. (2012) *Molecular and cellular biochemistry* **361**, 85-96
48. Ju, H., Scammel-La Fleur, T., and Dixon, I. M. (1996) *Journal of molecular and cellular cardiology* **28**, 1119-1128
49. Anwar, A., Taimor, G., Korkususz, H., Schreckenber, R., Berndt, T., Abdallah, Y., Piper, H. M., and Schluter, K. D. (2005) *Journal of molecular and cellular cardiology* **39**, 911-919
50. Meyer, R., Schreckenber, R., Kretschmer, F., Bittig, A., Conzelmann, C., Grohe, C., and Schluter, K. D. (2007) *Eur J Heart Fail* **9**, 1156-1162
51. Berger, H. J., Zaret, B. L., Speroff, L., Cohen, L. S., and Wolfson, S. (1976) *Circulation research* **38**, 566-571
52. Chazov, E. I., Pomoinetsky, V. D., Geling, N. G., Orlova, T. R., Nekrasova, A. A., and Smirnov, V. N. (1979) *Circulation research* **45**, 205-211
53. Lai, J., Jin, H., Yang, R., Winer, J., Li, W., Yen, R., King, K. L., Zeigler, F., Ko, A., Cheng, J., Bunting, S., and Paoni, N. F. (1996) *The American journal of physiology* **271**, H2197-2208
54. Hara, S., Arai, M., Tomaru, K., Doi, H., Koitabashi, N., Iso, T., Watanabe, A., Tanaka, T., Maeno, T., Suga, T., Yokoyama, T., and Kurabayashi, M. (2008) *Int Heart J* **49**, 329-342
55. Gloss, B., Villegas, S., Villarreal, F. J., Moriscot, A., and Dillmann, W. H. (2000) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E738-743
56. Wu, C. K., Lee, J. K., Chiang, F. T., Yang, C. H., Huang, S. W., Hwang, J. J., Lin, J. L., Tseng, C. D., Chen, J. J., and Tsai, C. T. (2011) *Crit Care Med* **39**, 984-992
57. Kao, Y. H., Chen, Y. C., Cheng, C. C., Lee, T. I., Chen, Y. J., and Chen, S. A. (2010) *Crit Care Med* **38**, 217-222
58. Palbykin, B., Borg, J., Caldwell, P. T., Rowles, J., Papoutsis, A. J., Romagnolo, D. F., and Selmin, O. I. (2011) *Cardiovasc Toxicol* **11**, 204-214

59. Blaukat, A., Ivankovic-Dikic, I., Gronroos, E., Dolfi, F., Tokiwa, G., Vuori, K., and Dikic, I. (1999) *J Biol Chem* **274**, 14893-14901
60. Pandey, P., Avraham, S., Kumar, S., Nakazawa, A., Place, A., Ghanem, L., Rana, A., Kumar, V., Majumder, P. K., Avraham, H., Davis, R. J., and Kharbanda, S. (1999) *J Biol Chem* **274**, 10140-10144
61. Heidkamp, M. C., Scully, B. T., Vijayan, K., Engman, S. J., Szotek, E. L., and Samarel, A. M. (2005) *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C471-482
62. Zhang, N., and Zhu, B. (2010) *Molecular and cellular biochemistry* **333**, 311-321
63. Ronkainen, V. P., Skoumal, R., and Tavi, P. (2011) *Journal of molecular and cellular cardiology* **50**, 1008-1016
64. Kemi, O. J., Ceci, M., Condorelli, G., Smith, G. L., and Wisloff, U. (2008) *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **15**, 145-148
65. Watanabe, A., Arai, M., Koitabashi, N., Niwano, K., Ohyama, Y., Yamada, Y., Kato, N., and Kurabayashi, M. (2011) *Cardiovascular research* **90**, 57-67
66. Vlasblom, R., Muller, A., Musters, R. J., Zuidwijk, M. J., Van Hardeveld, C., Paulus, W. J., and Simonides, W. S. (2004) *Cardiovascular research* **63**, 537-544
67. Yoshida, H. (2007) *Febs J* **274**, 630-658
68. Thuerauf, D. J., Hoover, H., Meller, J., Hernandez, J., Su, L., Andrews, C., Dillmann, W. H., McDonough, P. M., and Glembotski, C. C. (2001) *J Biol Chem* **276**, 48309-48317
69. Belmont, P. J., Tadimalla, A., Chen, W. J., Martindale, J. J., Thuerauf, D. J., Marcinko, M., Gude, N., Sussman, M. A., and Glembotski, C. C. (2008) *J Biol Chem* **283**, 14012-14021
70. Molkentin, J. D. (2004) *Cardiovascular research* **63**, 467-475
71. Liu, C. J., Cheng, Y. C., Lee, K. W., Hsu, H. H., Chu, C. H., Tsai, F. J., Tsai, C. H., Chu, C. Y., Liu, J. Y., Kuo, W. W., and Huang, C. Y. (2008) *Molecular and cellular biochemistry* **313**, 167-178
72. Vandecaetsbeek, I., Raeymaekers, L., Wuytack, F., and Vangheluwe, P. (2009) *Biofactors* **35**, 484-499
73. Assayag, P., Charlemagne, D., de Leiris, J., Boucher, F., Valere, P. E., Lortet, S., Swynghedauw, B., and Besse, S. (1997) *Hypertension* **29**, 15-21
74. Azhar, G., Zhang, X., Wang, S., Zhong, Y., Quick, C. M., and Wei, J. Y. (2007) *Basic research in cardiology* **102**, 233-244
75. Kaplan, P., Jurkovicova, D., Babusikova, E., Hudecova, S., Racay, P., Sirova, M., Lehotsky, J., Drgova, A., Dobrota, D., and Krizanova, O. (2007) *Molecular and cellular biochemistry* **301**, 219-226
76. Bigelow, D. J. (2009) *Pflugers Arch* **457**, 701-710
77. Dai, D. F., Santana, L. F., Vermulst, M., Tomazela, D. M., Emond, M. J., MacCoss, M. J., Gollahon, K., Martin, G. M., Loeb, L. A., Ladiges, W. C., and Rabinovitch, P. S. (2009) *Circulation* **119**, 2789-2797
78. Koitabashi, N., Arai, M., Tomaru, K., Takizawa, T., Watanabe, A., Niwano, K., Yokoyama, T., Wuytack, F., Periasamy, M., Nagai, R., and Kurabayashi, M. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 116-124

79. Sena, S., Hu, P., Zhang, D., Wang, X., Wayment, B., Olsen, C., Avelar, E., Abel, E. D., and Litwin, S. E. (2009) *Journal of molecular and cellular cardiology* **46**, 910-918
80. Domenighetti, A. A., Danes, V. R., Curl, C. L., Favalaro, J. M., Proietto, J., and Delbridge, L. M. (2010) *Journal of molecular and cellular cardiology* **48**, 663-672
81. Boudina, S., and Abel, E. D. (2007) *Circulation* **115**, 3213-3223
82. Hayat, S. A., Patel, B., Khattar, R. S., and Malik, R. A. (2004) *Clin Sci (Lond)* **107**, 539-557
83. Frank, K. F., Mesnard-Rouiller, L., Chu, G., Young, K. B., Zhao, W., Haghghi, K., Sato, Y., and Kranias, E. G. (2001) *Basic research in cardiology* **96**, 636-644
84. Reyes-Juarez, J. L., Juarez-Rubi, R., Rodriguez, G., and Zarain-Herzberg, A. (2007) *J Biol Chem* **282**, 35554-35563
85. Lehnart, S. E., Schillinger, W., Pieske, B., Prestle, J., Just, H., and Hasenfuss, G. (1998) *Ann N Y Acad Sci* **853**, 220-230
86. Sato, Y., Ferguson, D. G., Sako, H., Dorn, G. W., 2nd, Kadambi, V. J., Yatani, A., Hoit, B. D., Walsh, R. A., and Kranias, E. G. (1998) *J Biol Chem* **273**, 28470-28477
87. Knollmann, B. C. (2009) *J Physiol* **587**, 3081-3087
88. Chopra, N., and Knollmann, B. C. (2009) *J Cardiovasc Electrophysiol* **20**, 1179-1185
89. Novak, P., and Soukup, T. (2011) *Physiol Res* **60**, 439-452
90. Kasneci, A., Kemeny-Suss, N. M., Komarova, S. V., and Chalifour, L. E. (2009) *Cardiovascular research* **81**, 695-702
91. Arai, M., Tomaru, K., Takizawa, T., Sekiguchi, K., Yokoyama, T., Suzuki, T., and Nagai, R. (1998) *Journal of molecular and cellular cardiology* **30**, 243-254
92. Kurabayashi, M., Jeyaseelan, R., and Kedes, L. (1994) *J Biol Chem* **269**, 6031-6039
93. Hanninen, S. L., Ronkainen, J. J., Leskinen, H., and Tavi, P. (2010) *Cardiovascular research* **88**, 75-82

Semblanza del Dr. Ángel Zarain Herzberg



El Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg es Médico Cirujano y Doctor en Ciencias Biomédicas de la UNAM. Es Profesor Titular “C” de Tiempo Completo Definitivo adscrito al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM y es investigador nacional nivel 2 del SNI. El Dr. Zarain es miembro de varias sociedades tales como la Academia Mexicana de Ciencias, Sociedad Mexicana de Bioquímica, American Heart Association, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, International Society for Heart Research, International Academy for Cardiovascular Sciences y The New York Academy of Sciences. Tiene responsabilidades académicas como ser revisor externo de proyectos de Ciencia Básica y Salud de CONACyT y miembro del Comité Evaluador del PAPIIT del Área de las Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud.

En su laboratorio de Biología Molecular se trabajan dos líneas de investigación, la primera referente a la regulación de la transcripción de la bomba de calcio SERCA2 y de la Calsecuestrina en el Corazón. La segunda línea de investigación es relativa a la expresión de los genes de SERCA2 y SERCA3 en células cancerosas y en otros tejidos. Sus proyectos de investigación reciben apoyo económico por parte de CONACyT, PAPIIT-UNAM y Fundación Miguel Alemán. Ha publicado más de 50 artículos en revistas internacionales con arbitraje y varios capítulos en libros.

El Dr. Zarain ha contribuido a la formación de recursos humanos, fungiendo como director de 7 Tesis de Doctorado, 2 de Maestría y 2 de Licenciatura. Participa como tutor de estudiantes de posgrado de los programas de Doctorado de Ciencias Biomédicas, Ciencias Bioquímicas y Ciencias Biológicas de la UNAM. Es profesor de la asignatura de Bioquímica y Biología Molecular de la Carrera de Médico Cirujano de la UNAM. Ha impartido la materia de Bioquímica del Ejercicio en la Residencia de Medicina del Deporte de la UNAM, además de participar en el curso de posgrado de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología de Músculo de la UNAM.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 201-238, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014).

(<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

DINÁMICA DE LA RED MITOCONDRIAL: UN RECORRIDO POR LOS FENÓMENOS DE FUSIÓN-FISIÓN, LA ARQUITECTURA DE LAS CRESTAS Y LOS SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS

DYNAMIC OF MITOCHONDRIAL NETWORK: A TRIP THROUGH THE FUSION-FISSION PROCESS, RESPIRATORY SUPERCOMPLEXES AND CRISTA ARCHITECTURE.

Oscar Flores-Herrera^{1*}, Juan Pablo Pardo¹, Mercedes Esparza-Perusquía¹, Sofía Olvera-Sánchez¹, Guadalupe Guerra-Sánchez² y Federico Martínez¹.

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, ²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. oflores@bq.unam.mx

Resumen

En los últimos años se ha demostrado que las células contienen un retículo mitocondrial, en vez de mitocondrias aisladas e independientes, y que las crestas no son simples pliegues de la membrana interna sino que provienen de estructuras tubulares cuya arquitectura depende del estado energético del organelo. Así mismo, las mitocondrias se encuentran en un estado dinámico de

fusión y fisión que se puede alterar en respuesta al estado fisiológico de la célula. Aunado a esto, se ha demostrado que los complejos respiratorios y la F_1F_0 -ATP sintasa pueden encontrarse como unidades individuales o formando supercomplejos, los cuales son capaces de oxidar al NADH y reducir al oxígeno, o participar en la arquitectura de la cresta. En esta revisión se muestran los avances en el conocimiento de la dinámica mitocondrial, los mecanismos involucrados en su fusión y fisión, el modelo que predice la plasticidad en la asociación de los complejos respiratorios y su papel en la arquitectura y fisiología mitocondrial.

Palabras clave: Retículo mitocondrial; fusión y fisión mitocondrial; arquitectura de la cresta mitocondrial; supercomplejos respiratorios.

Abstract

In the last decade it has been shown that cells contain a mitochondrial reticulum, instead separate and isolated mitochondria, and that crista are not simple folds of the inner membrane but they are tubular structures whose architecture depends on the energy state of the organelle. Furthermore, the mitochondria have a dynamic state of fusion and fission which could be altered in response to the cell physiological state. In addition, it has been show that the respiratory complexes and the F_1F_0 -ATP synthase could be found as single units or joined in supercomplexes, which are capable of NADH oxidation and oxygen reduction, or participate in the architecture of the crista. In this review the advanced on mitochondrial dynamics, the mechanisms involved in the fusion and fission, the model predicts the plasticity of the association of the respiratory complexes and their role in the architecture and mitochondrial physiology are shown.

Keywords: Mitochondrial reticulum; mitochondrial fusion and fission, mitochondrial crista architecture; respiratory supercomplexes.

Introducción

Actualmente los libros de texto de bioquímica y biología celular presentan a la mitocondria como un organelo separado, independiente, que se encuentra en el citoplasma de la célula, de 7 μm de longitud y 0.5 a 1 μm de diámetro, con la forma de un frijol (Figura 1A) [1].

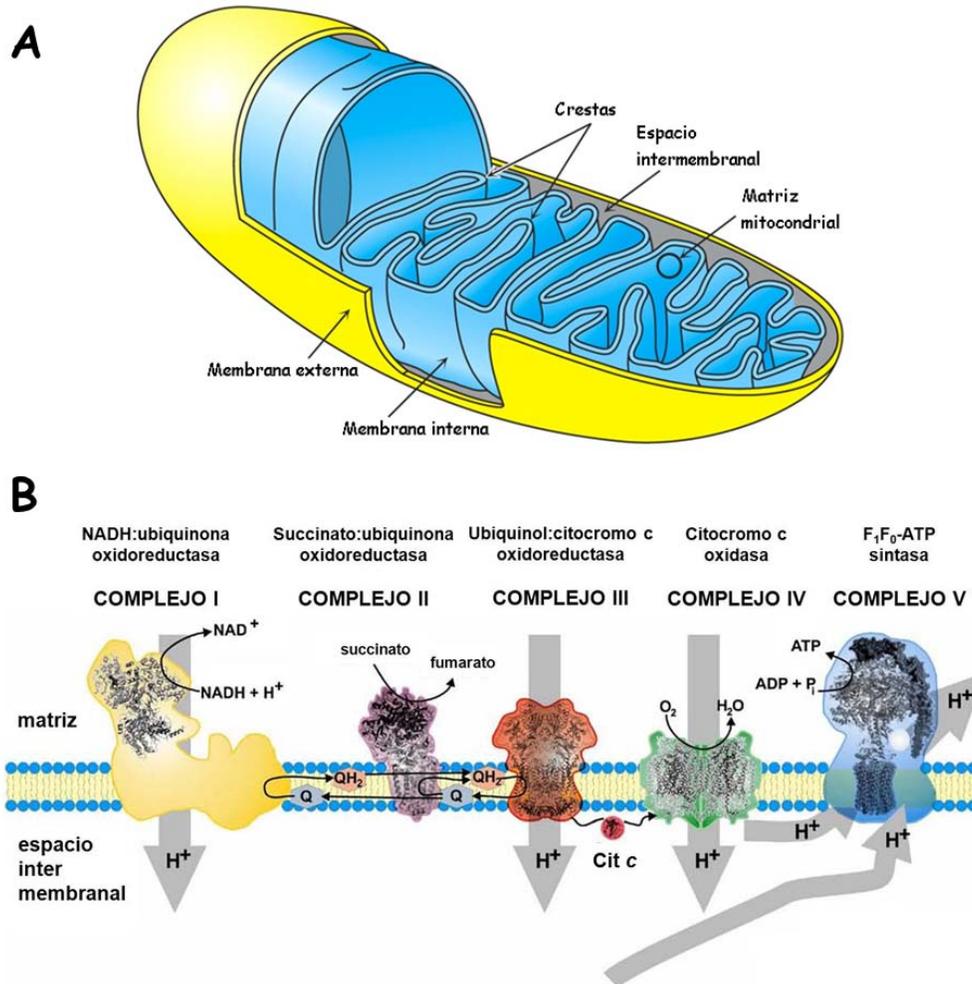


Figura 1. Visiones clásicas. A) La mitocondria se muestra con forma elíptica de su membrana externa y su membrana interna plegada en invaginaciones simples. B) La cadena respiratoria o de flujo de electrones se muestra como una colección de complejos respiratorios que se encuentran libres, independientes e integrados en la membrana interna; se indica la trayectoria de los electrones y la dirección del bombeo de los protones (H⁺) [Modificado de 1 y 2].

En este modelo clásico, las mitocondrias están formadas por dos membranas, una externa, que contiene una porina que permite el paso de una gran cantidad de moléculas e iones, y la otra interna, impermeable, con transportadores específicos para un buen número de moléculas, que se pliega para dar lugar a las crestas mitocondriales. El plegamiento de la membrana interna se muestra como el de una sábana. Esta arquitectura de las mitocondrias define dos espacios, el intermembranal y la matriz mitocondrial. Es en la

membrana interna mitocondrial, específicamente en las crestas, en donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, en donde participan los siguientes elementos: a) los complejos respiratorios (I, II, III₂ y IV), que se encargan de transportar los electrones desde el NADH + H⁺ o el succinato hacia el oxígeno y en este proceso generan un gradiente de potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$); b) la F₁F₀-ATP sintasa, que acopla el flujo de protones con la síntesis de ATP; y c) diferentes sistemas de transporte que permiten el flujo del piruvato, citrato, α -cetoglutarato, ATP, ADP y fosfato, entre otras moléculas. Cabe mencionar que en esta visión de la mitocondria se considera que los complejos respiratorios y la F₁F₀-ATP sintasa se encuentran como monómeros (Figura 1B). La matriz mitocondrial contiene las enzimas del ciclo de Krebs, de la β -oxidación de los ácidos grasos, del metabolismo de algunos aminoácidos y de la síntesis del precursor del grupo hemo, entre otras [1-3].

Sin embargo, en los últimos 15 años se ha demostrado que las células contienen un retículo mitocondrial, en vez de mitocondrias aisladas, que los complejos mitocondriales y la F₁F₀-ATP sintasa no se encuentran como unidades individuales sino formando supercomplejos, que las crestas no son simples pliegues de la membrana interna sino que provienen de estructuras tubulares, y que las mitocondrias se encuentran en un estado dinámico de fusión y fisión que se altera con el estado energético de la célula y en condiciones patológicas.

El retículo mitocondrial

Por medio de microscopía confocal y reconstrucción tridimensional de las imágenes de las mitocondrias marcadas con compuestos fluorescentes, como el mitotracker o la proteína verde fluorescente asociada a una proteína mitocondrial, se mostró la presencia de un retículo mitocondrial en una gran variedad de células. En la figura 2 se muestran tres tipos celulares, *Saccharomyces cerevisiae*, *Euglena gracilis* y un mioblasto de rata.

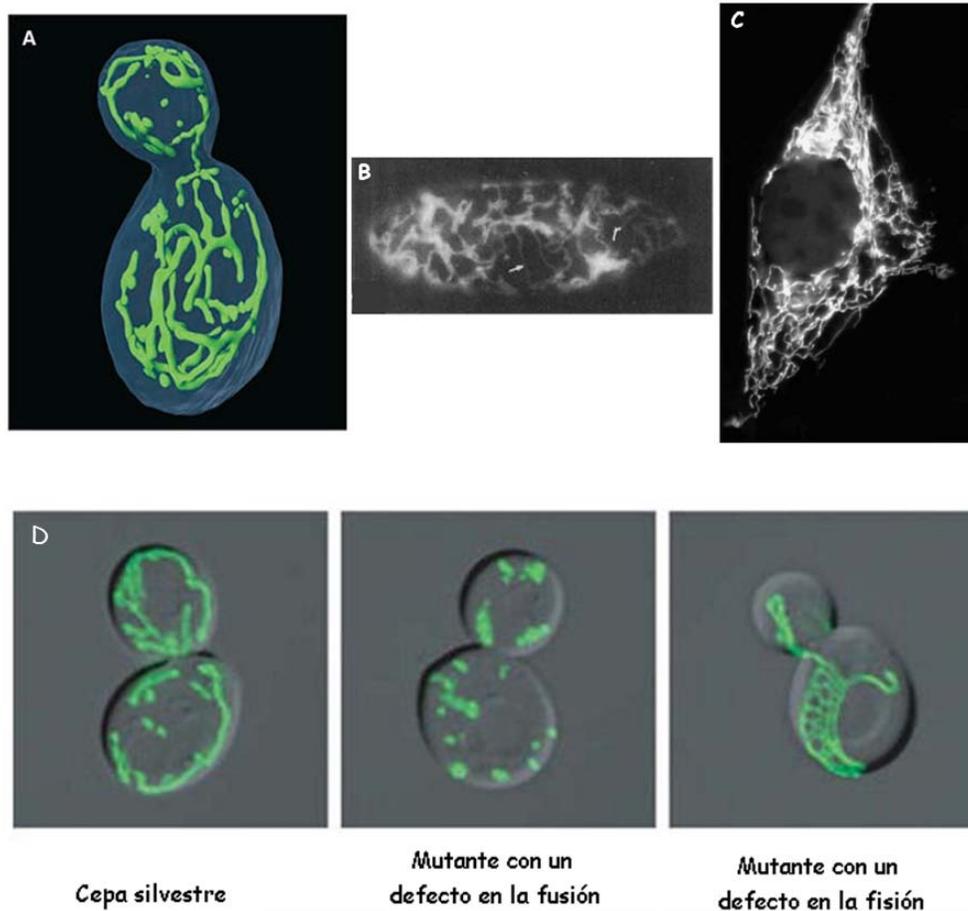


Figura 2. La red mitocondrial en las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* (A), en el alga unicelular *Euglena gracilis* (B), y en un mioblasto de rata (C). El efecto de la inhibición de la fusión o fisión sobre la morfología de la red mitocondrial en *S. cerevisiae* (D). En verde se muestra la red mitocondrial marcada con la proteína verde-fluorescente [Modificado de 4-7].

Es notoria la casi ausencia de mitocondrias aisladas en estas células. El panorama de la formación y la dinámica del retículo mitocondrial son bastante incompletos y fragmentados; por tanto, se carece de una visión global o un modelo general que incluya todos los elementos para explicar la fisiología de la red mitocondrial. La realidad es que hasta el momento los datos son escasos y sugieren que su dinámica depende de varios procesos, como son el de fusión y fisión mitocondrial, el de la interacción que hay entre la mitocondria y el retículo endoplásmico [8], y el de su interacción con elementos del citoesqueleto, que incluyen a los filamentos de actina y tubulina [9]. Estos factores, de alguna

manera, se integran e inciden en la formación de un retículo mitocondrial con una forma y tamaño específicos y una densidad acorde con las necesidades energéticas de la célula.

Experimentos con *S. cerevisiae* muestran la importancia de los procesos de fusión y fisión mitocondrial en la morfología del retículo mitocondrial. Cuando se inhibe el proceso de fusión, la red mitocondrial se fragmenta y se pierde el DNA mitocondrial; como era de esperarse, cuando se inhibe la fisión hay un incremento en la densidad de la red mitocondrial [7] (Figura 2D).

Una de las ventajas de tener a las mitocondrias en forma de retículo es que se protege el DNA mitocondrial. En células en las que se inhibe la fusión mitocondrial y se obtienen mitocondrias separadas unas de otras, con el tiempo el DNA se pierde [7]. También se ha propuesto que, desde un punto de vista de la bioenergética, la red mitocondrial funciona como un todo y su respuesta es más robusta a los cambios en las necesidades energéticas de la célula. Sin embargo, se desconocen los mecanismos y las proteínas que regulan la morfología del retículo mitocondrial en cada uno de los tipos celulares. Como se muestra en la figura 2, esta morfología es diferente para la levadura *S. cerevisiae* y para un mioblasto de rata.

Las mitocondrias, además de ser el compartimento para numerosas reacciones bioquímicas esenciales en la homeostasis energética, tienen un papel clave en la muerte y el envejecimiento celular [10]. Como hemos visto, este organelo constituye una red compleja, interconectada y altamente dinámica, mantenida por eventos permanentes, opuestos y balanceados de fusión y fisión [4, 11]. Tanto el número de túbulos como sus conexiones, así como su distribución subcelular, son controlados activamente. De esta forma se ha acuñado el término “dinámica mitocondrial” para englobar, al menos, tres procesos distintos: a) el remodelado del retículo mitocondrial mediante procesos de fusión/fisión, el cual se encuentra estrechamente vinculado al estado metabólico celular (Figura 6, ver más adelante) y es controlado por la actividad de las hidrolasas de trifosfato de guanosina (GTPasas) relacionadas con la familia de las dinaminas; b) la motilidad mitocondrial, particularmente relevante en células polarizadas, que corresponde al desplazamiento de las mitocondrias dependiente de los motores kinesina 1 y 3 y de los adaptadores Milton y Miro hacia una región subcelular específica [12], con lo que se asegura el suministro local de ATP en procesos biológicos con elevados requerimientos energéticos o el uso de estos organelos como amortiguadores de calcio [13] y c) el remodelado de la ultraestructura mitocondrial y la condensación

de su matriz, procesos considerados clásicamente como un reflejo del estado metabólico mitocondrial [14]. En este sentido, el remodelado de las crestas mitocondriales es un ejemplo de la interrelación entre los distintos estados funcionales de la mitocondria y su ultraestructura, observado éste en la transición entre el estado III y el IV de la respiración mitocondrial o durante la apoptosis [15, 16].

La maquinaria de fusión mitocondrial

Los principales reguladores de la fusión mitocondrial en el humano son las proteínas mitofusinas (Mfn) y la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1) (Figura 3). La Mfn tiene dos isoformas, Mfn1 y Mfn2, que se localizan en la membrana externa mitocondrial con sus dominios N-terminal (dominio de GTPasa) y C-terminal orientados hacia el citosol, las cuales interactúan entre sí para coordinar la fusión de la membrana externa de mitocondrias independientes [17, 18]. La OPA1 se localiza en el espacio intermembranal asociada a la membrana interna mitocondrial, donde participa en el remodelado de las crestas mitocondriales [19, 20]. Aunque el fenómeno de fusión de las membranas interna-interna y externa-externa tiene como finalidad integrarlas, es claro que funcionan como dos eventos independientes y separados; mientras que la fusión de la membrana externa mitocondrial requiere de una baja concentración de GTP, la fusión de la membrana interna requiere de una gran hidrólisis de GTP, además de depender del $\Delta\Psi_m$ y de una alta síntesis de ATP [21].

Evidencias recientes muestran que la fusión regula directamente el metabolismo mitocondrial. De esta forma, la disminución de la concentración de la proteína OPA1 o de cualquiera de las dos Mfn mediante el RNA de interferencia (RNAi), conduce a la formación de mitocondrias fragmentadas con bajo consumo de oxígeno y un bajo $\Delta\Psi_m$ [22]. Aunque se conoce la función de las proteínas Mfn y OPA1 en la fusión y el remodelado mitocondrial, su relación con la maquinaria metabólica se desconoce, así como el por qué la pérdida de algunas de estas proteínas interfiere directamente con la respiración celular.

Por el contrario, la sobreexpresión de la Mfn2 incrementa directamente la actividad de los complejos respiratorios, las vías oxidativas mitocondriales y la glucólisis [23]. En este sentido, se ha observado que en las ratas Zucker (de fenotipo obeso), así como en pacientes obesos y diabéticos, la expresión de Mfn2

está disminuida en el músculo esquelético, lo que destaca la importancia de las alteraciones en la dinámica y la morfología mitocondrial en ciertas patologías y hace evidente que la plasticidad mitocondrial es crítica para la función de este organelo [24, 25].

La maquinaria de la fisión mitocondrial

En los mamíferos la fisión mitocondrial está regulada por la actividad de la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp-1) y la proteína de fisión 1 (Fis1). Aunque la Drp-1 es homóloga de las dinaminas (las GTPasas que regulan el tráfico vesicular y la endocitosis), su participación en este proceso es aún materia de debate. Sin embargo, uno de los modelos postula que estas proteínas actúan como mecanoenzimas, es decir, que participan activamente en el corte de membranas por constricción [26]. La Drp-1 es una proteína de distribución principalmente citoplasmática, pero una fracción se localiza en puntos específicos de la membrana externa mitocondrial, los cuales representan futuros sitios de fisión (Figura 3). Debido a que la Drp-1 carece de una secuencia de destino mitocondrial, se ha sugerido que es reclutada a la membrana a través de Fis1, la principal proteína adaptadora que participa en el ensamblaje de complejos de fisión de alta masa molecular [26]. Actualmente, la interacción directa entre Fis1 y Drp-1 sólo se ha demostrado con proteínas recombinantes, a diferencia de lo observado en levaduras, en las que la localización mitocondrial de Dnm1p (homólogo de Drp-1) se pierde completamente en mutantes para Fis1p (homólogo de Fis1) [27]. En *S. cerevisiae* Fis1p recluta a Dnm1p a través de los adaptadores moleculares Mdv1p y Caf4p [28]; sin embargo, aún no se ha demostrado la existencia de estas proteínas en los mamíferos.

Es importante aclarar que el proceso de fisión mitocondrial ocurre habitualmente en todas las células en condiciones fisiológicas sanas. Sin embargo, la fisión mitocondrial también se ha asociado a condiciones de estrés metabólico, así como a la autofagia y la apoptosis [32-34].

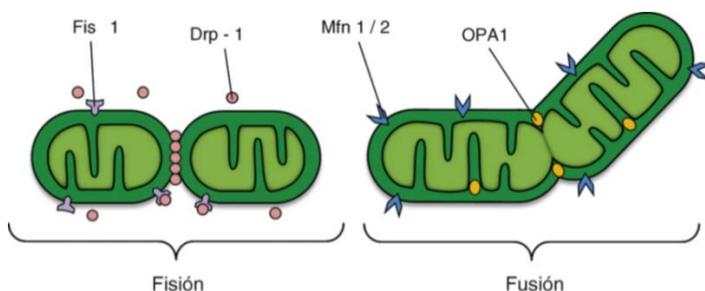


Figura 3. Modelos propuestos para la participación de las proteínas Fis1, Drp-1, Mfn 1/2 y OPA1 en la dinámica mitocondrial [Modificado de 29].

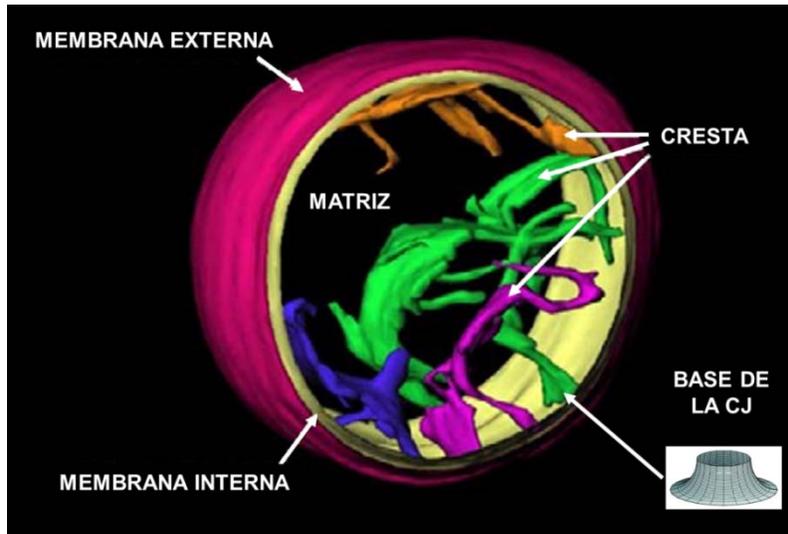


Figura 4. Modelo mitocondrial construido a partir de la criotomografía electrónica de las membranas de una mitocondria intacta. Las mitocondrias de hígado de rata se aislaron, se congelaron e hidrataron. Esta mitocondria tiene un diámetro de 700 nm. La membrana interna comprende regiones curvadas y tubulares que coexisten o se fusionan con segmentos laminares aplanados. La imagen

general es la de una membrana continua altamente interconectada (Modificado de 30]. En el recuadro se muestra el modelo para una unión de cresta (CJ) [Modificado de 31].

Es importante aclarar que el proceso de fisión mitocondrial ocurre habitualmente en todas las células en condiciones fisiológicas sanas. Sin embargo, la fisión mitocondrial también se ha asociado a condiciones de estrés metabólico, así como a la autofagia y la apoptosis [32-34].

Las crestas mitocondriales

Inicialmente se propuso que las crestas resultaban de la invaginación de la membrana interna mitocondrial, semejante al plegamiento de una sábana o una hoja de papel (visión clásica del libro de texto, Figura 1). Sin embargo, se ha demostrado la presencia de estructuras tubulares (Figura 4), en forma de muesca, que conectan a las crestas con la membrana interna mitocondrial y a las cuales se les llama unión de la cresta (crista junction, CJ) [31]. Estas estructuras tienen un diámetro de 12 a 40 nm y una longitud de 30 a 50 nm (Figura 4, recuadro).

Una de las posibles funciones de estas CJ podría ser la de limitar el compartimiento que corresponde a la cresta y el que se encuentra frente a la

membrana externa. De esta manera, los CJ podrían representar barreras para la difusión de moléculas entre el espacio de la cresta y el espacio intermembranal, lo que tendría un impacto en la fosforilación oxidativa [35, 36]. La diferente distribución de los complejos respiratorios y de la F_1F_0 -ATP sintasa también sugiere la presencia de dos compartimientos delimitados por las CJs [35]. Por ejemplo, se ha encontrado que los componentes de la fosforilación oxidativa, las proteínas encargadas de la síntesis de los centros hierro-azufre y las de la síntesis de proteínas se encuentran en la membrana de la cresta, mientras que las proteínas que participan en el transporte de proteínas a la mitocondria están en la membrana que se encuentra frente a la membrana externa [37]. Al igual que con el retículo mitocondrial, la morfología de las crestas varía de una célula a otra e inclusive dentro de la misma célula, sin embargo los factores que determinan esta morfología se desconocen [35, 36].

Asimismo, la topología de la membrana interna mitocondrial –las crestas– cambia con el estado energético de la mitocondria. En el estado III de la respiración mitocondrial [38], cuando la concentración de ADP es alta y la mitocondria entra en el modo de síntesis de ATP, este organelo adopta una conformación o estado condensado, con un espacio muy grande entre las crestas [30]. Por otro lado, cuando la concentración de ADP baja (estado IV), la mitocondria cambia al estado ortodoxo, en el cual el volumen entre las crestas disminuye [30] (Figura 6, más adelante). Esta transición entre el estado ortodoxo y condensado se relaciona con un balance dinámico entre la fusión y la fisión de las crestas.

Aunque no se va a tratar en esta revisión, es importante mencionar que la liberación del citocromo *c* por la mitocondria al inicio del proceso de apoptosis requiere la remodelación de las crestas mitocondriales, con un incremento en los procesos de fusión y ensanchamiento de las CJs [16].

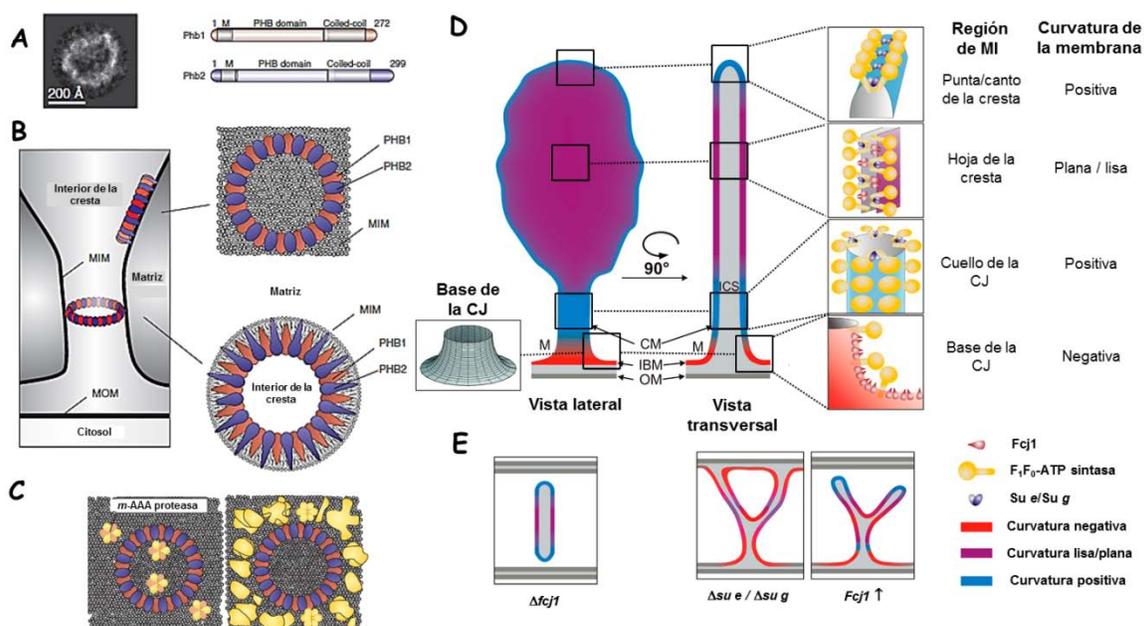


Figura 5. Elementos proteicos involucrados en el modelo para la estructura y formación de la cresta mitocondrial. A) Micrografía electrónica de partícula sencilla del complejo prohibitina (PHB) purificado de *S. cerevisiae*. Dominio estructural de la Phb1 y Phb2. Donde se indica M = dominio de membrana; MIM = membrana interna mitocondrial; MOM = membrana externa mitocondrial. B) Complejo PHB en forma de anillo embebido en la membrana interna mitocondrial. Estudios de entrecruzamiento sugieren un arreglo alternado de PHB1 y PHB2 en el anillo. El anillo de PHB, además de integrarse en la membrana, puede acomodarse de manera perpendicular al eje de la cresta tubular, próxima a la CJ. De acuerdo a este modelo, el anillo de PHB puede constituir una barrera contra la difusión de la membrana de la cresta y contribuir a la estabilidad de la cresta tubular. C) El complejo PHB puede reclutar diferentes proteínas, tales como la proteasa *m*-AAA (mostrada en amarillo y pardo), definiéndose así microdominios funcionales dentro de la membrana interna; o puede excluir proteínas de membrana (mostradas en amarillo) de zonas específicas de la bicapa lipídica y generar así parches libres de proteínas [39]. D) Representación esquemática de la curvatura de la membrana en las diferentes regiones de la cresta y la localización submitocondrial de la proteína Fcj1 y las subunidades *e* y *g* (para detalles ver texto). La curvatura positiva de la membrana está indicada en azul, la curvatura negativa en rojo, y las regiones con ambas curvaturas o ninguna en especial está en púrpura. El esquema representativo de una cresta con una sola CJ se muestra en su vista lateral (izquierda) y su sección transversal después de un giro de 90° (en el medio). Las ampliaciones del área enmarcada muestran el arreglo propuesto de Fcj1, Sub *e*/Sub *g*, y la F₁F₀-ATP sintasa y su influencia en la curvatura de la membrana [40]. El recuadro de la izquierda muestra la estructura tubular propuesta para la unión de las crestas (CJ) a la membrana interna mitocondrial [31]. E) Esquema de la curvatura de la membrana en las crestas en cada una de las mutantes indicadas. La pérdida de Fcj1, provoca que la curvatura positiva de la membrana sea predominante, mientras que las curvaturas negativas son ausentes. La pérdida de las Su *e*/Su *g* produce la reducción del número de curvaturas positivas, lo que provoca en las crestas el aumento

de su volumen, su diámetro y su ramificación, con una importante reducción en el número de puntas de cresta. De manera similar, el incremento en la Fcj1 produce un fenotipo similar, aunque sí se tiene la presencia de puntas. ICS = espacio interno de la cresta; M = matriz [Modificado de 40].

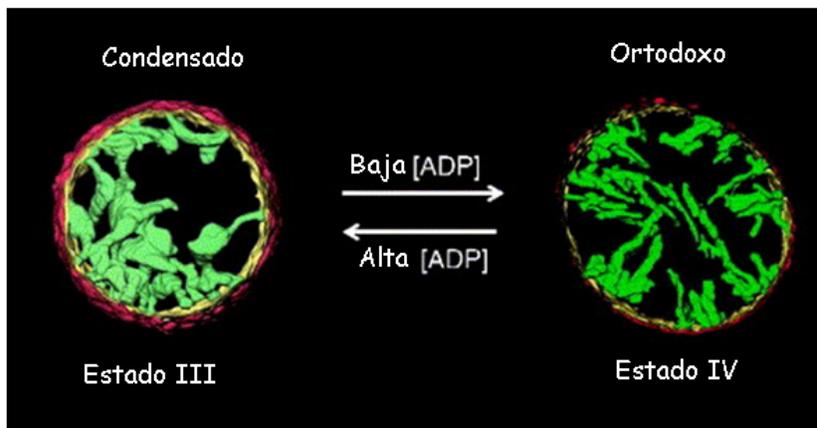


Figura 6. Cambios en las crestas mitocondriales en función del estado energético de las mitocondrias. En rojo se muestra la membrana mitocondrial externa, en amarillo la membrana interna y en verde las crestas. Estado III = alta velocidad de consumo de oxígeno asociado a la

síntesis de ATP; Estado IV = consumo basal de oxígeno sin la síntesis de ATP [Modificado de 30].

Factores que participan en la formación de las crestas

Se han propuesto varios modelos para explicar la formación de las crestas y se han identificado distintas proteínas que son esenciales para que se lleve a cabo este proceso. La ausencia de éstas conduce a mitocondrias con morfologías aberrantes y, en algunos casos, con membranas internas en forma de aros de cebolla. Entre estas proteínas se encuentran las formas oligoméricas de la F_1F_0 -ATP sintasa (Figuras 5 y 13). Cuando se evita la formación del dímero de esta enzima, se inhibe la formación de las crestas y las mitocondrias adquieren una morfología en aros de cebolla [41]. Por ejemplo, al eliminar los genes que codifican para las subunidades e y g de la F_1F_0 -ATP sintasa se obtienen solamente los monómeros de la F_1F_0 -ATP sintasa y las mitocondrias presentan los defectos morfológicos descritos arriba [41]. La tabla I muestra algunas de las proteínas que están involucradas en la morfología de las crestas. Para algunas de ellas, se ha visto que su carencia o mutación se asocia con enfermedades específicas. Tal es el caso de la subunidad ATP6 de la F_1F_0 -ATP sintasa, que forma parte del canal de protones de esta enzima, y cuya carencia está relacionada con las enfermedades mitocondriales NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa) y MILS (síndrome de Leigh heredado por vía materna).

PINK1 es una proteína cinasa mitocondrial que fosforila residuos de serina y treonina y que se asocia con la enfermedad de Parkinson cuando su funcionamiento es defectuoso. La atrofia óptica autosómica dominante y el síndrome de Wolf-Hirschhorn aparecen cuando hay defectos de las proteínas OPA1 y LETM1. OPA1 interviene en la remodelación de los CJ, la fusión de la membrana interna mitocondrial y la formación y mantenimiento de las crestas, mientras que LETM1 es una chaperona para las proteínas que residen en la membrana interna mitocondrial. Dos proteínas merecen una mención especial. Las prohibitinas, PHB1 y PHB2, cuya función es variada y compleja y que están involucradas en procesos como el mantenimiento del DNA mitocondrial, la regulación del procesamiento proteolítico de OPA1 y un papel de chaperonas en la membrana interna mitocondrial [19, 20]. Defectos en la función de estas proteínas se han asociado a varios tipos de cáncer y enfermedades degenerativas [42, 43]. Los heterodímeros de prohibitinas (PHB1 y PHB2) forman un supercomplejo con una masa molecular por arriba de 1 MDa y que se asocia a la proteasa *m*-AAA, que a su vez procesa a OPA1 [44].

La figura 5 muestra la estructura anular del complejo formado por PHB1 y PHB2 (Figura 5A), su inserción en la membrana interna mitocondrial (Figura 5B), y su posible asociación con la proteasa *m*-AAA o la exclusión de proteínas de la bicapa lipídica, para establecer una región libre de proteínas (Figura 5C). Mutaciones en el gen de la mitofilina se asocian con el síndrome de Down. Esta proteína, además de participar en la formación de las crestas y las CJs, tiene un papel importante en la fusión de las mitocondrias. También los fosfolípidos, como la cardiolipina, que se encuentra casi exclusivamente en la membrana interna mitocondrial, participan en la formación de las crestas, ya que la carencia de la tafazzina, una aciltransferasa involucrada en la síntesis de fosfolípidos mitocondriales, conduce a una desorganización de éstas. Mutaciones en los genes que codifican para las proteínas que se mencionaron arriba resulta en mitocondrias con defectos en las crestas mitocondriales [18].

Tabla I. Proteínas que participan en la formación de las crestas y la morfología mitocondrial [Modificado de 19].

Proteína (organismo)	Defecto morfológico de la mitocondria	Función	Enfermedad a la que se asocia
ATP21p, ATP20p, ATP4p (S. cerevisiae)	Crestas mitocondriales que semejan aros de cebolla	Dimerización de la ATP sintasa	
ATP6 (H. sapiens)	Mitocondrias con vesículas y septos	Subunidad del canal de protones de la ATP sintasa	NASRP y MILS
PINK1 (H. sapiens)	Mitocondrias con crestas fragmentadas	Proteín cinasa que fosforila serinas y treoninas	Enfermedad de Parkinson
Tafazzina (H. sapiens)	Mitocondrias fragmentadas	Aciltransferasa mitochondrial que participa en la síntesis de cardiolipina	Síndrome de Barth
LETM1 (H. sapiens)	Fragmentación mitochondrial	Chaperona de proteínas mitochondriales	Síndrome de Wolf- Hirschhorn
OPA1 (H. sapiens)	Reducción en el número de las crestas	Remodelación de los CJs, fusión de la membrana interna mitocondrial y formación y mantenimiento de las crestas	Atrofia óptica autosómica dominante
Prohibitinas, PHB1 y PHB2 (H. sapiens)	Pérdida de las crestas	Mantenimiento del DNA mitochondrial, regulación del procesamiento de OPA1	Varias formas de cáncer
Mitofilina (H. sapiens)	Ausencia de CJs y desorganización de la membrana interna mitochondrial.	Organización de las crestas y los CJs.	Síndrome de Down.

Entre los diferentes modelos que se han propuesto para la formación de las crestas, dos son los más sencillos. El primero se denomina modelo de

invaginación, y en éste se propone que, debido a la mayor producción de membrana interna, hay una tendencia al plegamiento de esta membrana que es termodinámicamente favorable, pero que una vez que se inicia este plegamiento, se reclutan las proteínas involucradas en la formación de las CJ y se continúa con su formación (Figura 7A). En el segundo modelo, denominado modelo del globo, hay un agrupamiento inicial de los componentes proteicos de las CJ y a partir de estos se inicia la formación de la cresta (Figura 7B).

Supercomplejos respiratorios

En la mitocondria la cadena de transporte de electrones (CTE) genera el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\Psi_m$) que es indispensable para la síntesis de ATP. A mediados del siglo pasado se reconocieron 4 complejos respiratorios encargados de generar el $\Delta\Psi_m$ a través de la membrana interna mitocondrial, denominados NADH:coenzima Q oxidoreductasa (Complejo I), succinato:coenzima Q oxidoreductasa (Complejo II), ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa (Complejo III₂) y citocromo oxidasa (Complejo IV). Aunque su estequiometría depende del método empleado para cuantificar su concentración (Tabla II), se ha calculado para las mitocondrias de corazón de bovino que la relación entre los Complejo I:Complejo II:CoQ:Complejo III₂:citocromo c:Complejo IV es de 1:2:64:3:9:8. Aunado a esto, por cada Complejo I se tienen 5 unidades de la F₁F₀ ATP-sintasa (Complejo V) y 40 del translocador de ADP/ATP. A partir de la purificación y cuantificación de los diferentes complejos, en los 80's se acuñó el modelo de difusión y colisión al azar para explicar el flujo de electrones a través de estos complejos dispersos en la membrana [45], basándose en su encuentro casual.

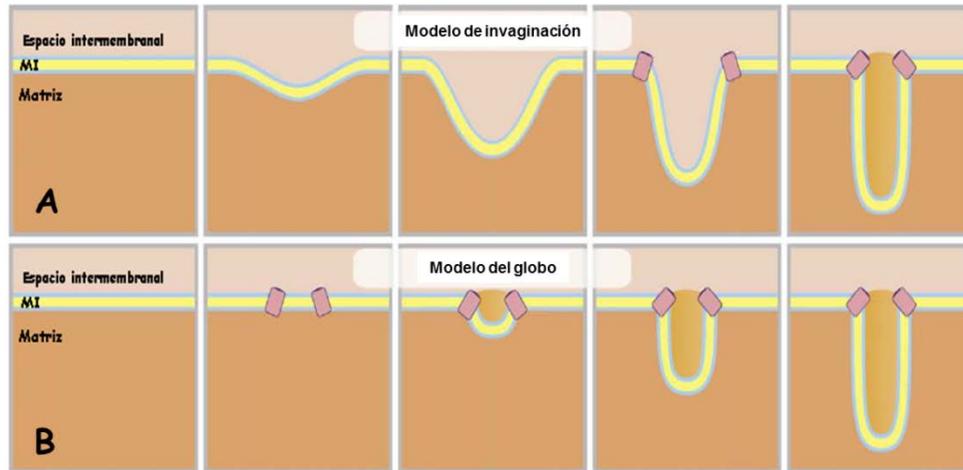


Figura 7. Mecanismos propuestos para la formación de las crestas. A) El modelo de invaginación supone el inicio de la cresta previo a la incorporación de los elementos proteicos de la CJ; en contraste, el modelo del globo (B) el reclutamiento de los elementos proteicos de la CJ es previo a la formación de la cresta. MI = membrana interna mitocondrial [Modificado de 18].

En las últimas décadas se han presentado evidencias experimentales que demuestran que los complejos respiratorios se encuentran organizados en supercomplejos o respirosomas, lo que se ha denominado como el modelo sólido de la CTE. Una hipótesis interesante que se deriva de este modelo es que las interacciones específicas y dinámicas entre los complejos individuales podrían permitir que se adquieran nuevas propiedades (canalización del sustrato, estabilidad y regulación) que no se podía predecir con el análisis reduccionista previo. Aunque las evidencias sobre el modelo sólido están consolidadas [46], existen muchas otras que apoyan al modelo de difusión al azar, por lo que se ha empezado a definir un modelo de plasticidad para la CTE, o de microdifusión de los sustratos entre los complejos.

Evidencias electroforéticas de la asociación de la CTE en supercomplejos

Aunque en la década de los 80's se reportó la posible asociación entre los complejos respiratorios [47], ésta no fue bien recibida por la comunidad científica. Sin embargo, todo cambió cuando Schägger [48] describió que los supercomplejos pueden ser solubilizados con un detergente suave, como la digitonina, y separados por su movilidad electroforética empleando la técnica de electroforesis en condiciones nativas en geles de poliacrilamida usando al azul de Coomassie® para conferirle carga negativa a las proteínas (BN-PAGE, por sus siglas en inglés)

[49] (Figura 8). Desde entonces se considera que los supercomplejos representan el estado fisiológico de los complejos respiratorios y han sido descritos en diversos tejidos de mamíferos tales como el cerebro [50], el hígado [51], el riñón [51], el músculo esquelético [51, 52] y el corazón de rata [51-52], así como el corazón de bovino [48, 53], los fibroblastos de piel humana [54] y el trofoblasto humano [55]. También se han descrito en otros organismos tales como los peces [56], los hongos [57, 58], *Caenorhabditis elegans* [59], *Drosophila* [60], algunas plantas [61, 62] y en bacteria [63, 64].

No obstante que la composición y estequiometría de los supercomplejos varía entre las diferentes especies, el supercomplejo I₁-III₂-IV₁₋₄ es el más interesante debido a que reúne a los complejos que permiten el flujo de los electrones desde el NADH hasta el oxígeno (llamado *respirosoma*). Sin embargo, en algunos organismos como *S. cerevisiae*, que carece de Complejo I, el principal supercomplejo es el III₂-IV₂. Aunque el Complejo I se ha reportado como monómero, se ha sugerido la presencia de su dímero en *Neurospora crassa*, *Yarrowia lipolytica* y *Solanum tuberosum* [57, 58 y 65].

Tabla II. Concentración de los complejos mitocondriales de corazón de bovino y su distribución en los supercomplejos

Complejo I	Complejo II	Q ₁₀	Complejo III ₂	Citocromo c	Complejo IV	Complejo V	
0.06-0.13 ^{ab}	0.19 ^e	6-8	0.25-0.53 ^e	0.80-1.02 ^e	0.60-1.00 ^e	0.52-0.54 ^a	
0.08 ^c	0.11 ^f		0.30 ^g	0.35	0.80-1.13 ^e		
	0.20 ^f	3.4-4.0	0.34 ^g	0.45	1.31 ^e		
1.1 ^d	1.3 ^e	3.0 ^{de}					
X = 0.09	X = 0.167	X = 5.35	X = 0.355	X = 0.655	X = 0.968	X = 0.53	
<i>Distribución en los supercomplejos</i>							
I ₁ :III ₂ :IV ₄	I ₁ :III ₂ :IV ₃	I ₁ :III ₂ :IV ₂	I ₁ :III ₂ :IV ₁	I ₁ :III ₂	Complejo I libre (15%)	Complejo III ₂ libre (41%)	Complejo IV libre (>85%)
(1%)	(3%)	(9%)	(54%)	(17%)			
0.0009	0.0027	0.0081	0.0486	0.0153	0.0135	0.145	0.8223

La concentración está expresada en nmol/mg de proteína. Los valores fueron calculados por comparación con el contenido de Complejo III₂ cuya cantidad, obtenida por diferentes autores, fue normalizada a un valor de 3: ^a Obtenido a partir de experimentos de unión del inhibidor; ^b Valor estimado por resonancia paramagnética del electrón (EPR) y por titulación por anticuerpos; ^c Basado en el contenido del flavin mononucleótido (FMN); ^d Determinado por densitometría-electroforética; ^e Determinado por análisis espectrofotométrico; ^f Basado en el contenido del flavin adenin dinucleótido (FAD) no extraíble por ácido; ^g Basado en la cantidad media del contenido de citocromo *b*, determinado espectrofotométricamente [Modificado de 66-69]. Para la distribución de los complejos en los supercomplejos se consideró el porcentaje reportado por Shägger [63] (mostrado entre paréntesis) y el promedio de la concentración determinada por diversos métodos. La concentración está expresada en nmol/mg proteína.

Adicionalmente se ha observado que los supercomplejos pueden tener asociados otras proteínas como el translocador de ADP/ATP, algunas chaperonas de la citocromo *c* oxidasa y la anhidrasa carbónica [65, 70, 71], además de algunos transportadores de monocarboxilatos, la sintasa de óxido nítrico mitocondrial y los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ [72, 73]. Todas estas interacciones subrayan la importancia fisiológica que tienen los supercomplejos en el metabolismo mitocondrial.

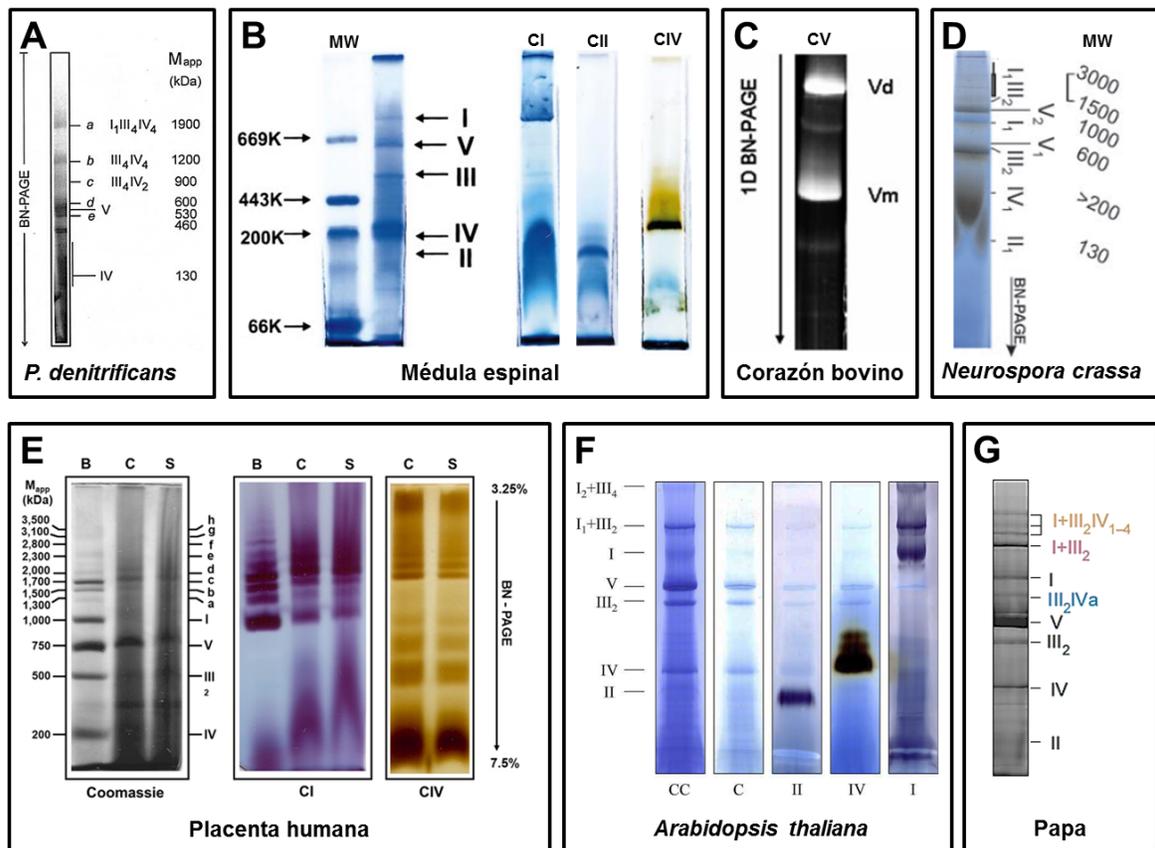


Figura 8. Actividad en gel de los complejos respiratorios y de la fosforilación oxidativa de diferentes organismos. Los complejos fueron solubilizados con digitonina y resueltos por su movilidad electroforética en una BN-PAGE. A) *Paracoccus denitrificans* [Modificado de 64]; B) Médula espinal de ratón, donde se indica CI = complejo I, CII = complejo II, CIV = complejo IV [Modificado de 50]; C) Corazón de bovino, donde se indica CV = complejo V, Vd = dímero del complejo V, Vm = monómero del complejo V [Modificado de 74]; D) *Neurospora crassa* [Modificado de 57]; E) Placenta humana, donde se indica Coomassie = tinción con azul de Coomassie®, B = mitocondrias de corazón de bovino como marcadores de peso molecular y actividad, C = citotrofoblasto, S = sinciotrofoblasto [Modificado de 55]; F) *Arabidopsis thaliana* donde se indica CC = tinción con Coomassie®, C = control de corrida [Modificado de 75]; G) *Solanum tuberosum* [Modificado de 76].

Análisis de control de flujo metabólico

La primera demostración funcional de la existencia de los supercomplejos fue el análisis cinético de la poza de quinonas (Q_{10}) y del citocromo c en las

mitocondrias de *S. cerevisiae* [Boumans 1998, citado en 46]. Sin embargo, debido a que fue necesaria la presencia de agentes caotrópicos para que se observara el comportamiento homogéneo de la poza de quinonas en estas mitocondrias, éste se consideró como una peculiaridad de este organismo; además estos resultados contrastaban con el comportamiento homogéneo de la poza de Q_{10} descrito para las mitocondrias de corazón de bovino en los trabajos cinéticos de Kroger y Klingenberg [77] que posteriormente fueron confirmados por los estudios de microscopía electrónica de Hackenbrock [78]. Aunado a esto, la noción de una distribución al azar de los complejos fue apoyada por el hecho de que los anticuerpos en contra del Complejo III₂ y del Complejo IV agregan a estos complejos por separado [79]. Adicionalmente, estudios sobre la movilidad de los complejos mitocondriales por medio de la determinación de su relajación electroforética o de la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP por sus siglas en inglés) permitieron calcular que el coeficiente de difusión lateral (D) para los complejos en la membrana mitocondrial está en el intervalo de 10^{-9} y 10^{-10} cm²/s [Eisinger 1986, citado en 46]; en este mismo sentido se determinó que la Q_{10} es un acarreador móvil de electrones, aunque su velocidad de difusión variaba dependiendo de la técnica empleada (por ejemplo, el apagamiento de la fluorescencia o FRAP). En los estudios reportados por Hackenbrock [78] se reportó un valor de D para la Q_{10} entre 10^{-8} y 10^{-9} cm²/s. Con todas estas evidencias se dio cuerpo al modelo de difusión y colisión al azar para la transferencia de los electrones. Sin embargo, Lenaz y col. [Lenaz 1986, citado en 46] determinaron que el D para la Q_{10} tiene un valor de 10^{-6} cm²/s, con lo que concluyeron que la difusión de la ubiquinona era tan grande que no podía considerarse como el paso limitante. Así pues, estos autores emplearon el análisis de control de flujo metabólico para confirmar la existencia de los supercomplejos en las mitocondrias de los mamíferos y las plantas [Bianchi 2004, citado en 46].

El análisis de control de flujo metabólico permite determinar cuantitativamente el control que ejerce dentro de una vía metabólica cada una de las enzimas que la constituye. Se supone en la teoría de este análisis, que las enzimas independientes están unidas por la difusión de los metabolitos intermediarios comunes. En una vía metabólica donde las enzimas difunden libremente, el control puede ser ejercido por una o más de estas enzimas, pero la suma de los coeficientes del control de flujo (C_i) de todos los pasos deberá aproximarse a 1 y no ser mayor. El C_i de una enzima dentro de una vía metabólica está definida como:

$$C_i = [(dJ/dI)_{I=0}] / [(dv_i/dI)_{I=0}]$$

donde $(dv_i/dI)_{I=0}$ representa cambios infinitesimales de la actividad de la enzima (v_i) inducidos por la acción de un inhibidor específico (I); y $(dJ/dI)_{I=0}$ es el cambio infinitesimal en el flujo de la vía metabólica completa (J) inducidos por el mismo inhibidor [80].

La situación contraria podría ocurrir en los supercomplejos enzimáticos donde las interacciones entre los sitios activos son estables y los sustratos e intermediarios son canalizados de un sitio activo a otro sin abandonar el ambiente proteico; en tales supercomplejos, la vía metabólica podría comportarse como una sola unidad enzimática y cada componente de la unidad catalítica podría ejercer el mismo control de flujo. En particular, en un sistema donde la CTE está totalmente separada del resto de los componentes del sistema fosforilante (por ejemplo la F_1F_0 -ATP sintasa, los acarreadores o el potencial de membrana), la existencia de un supercomplejo podría mostrar un coeficiente de control de flujo cercano a la unidad para cualquiera de los complejos respiratorios que lo constituyen, y la suma de los coeficientes aparentes podrían ser superiores a 1 [81].

Como se explicó arriba, los coeficientes de control de flujo se obtienen por medio de la titulación de una enzima con un inhibidor específico, verificando su repercusión en la actividad de la enzima y en el flujo de la vía metabólica completa. En este sentido, si se observa una mayor inhibición de la actividad enzimática con respecto al flujo de la vía, significa que la enzima analizada no es un paso limitante dentro de la vía y presentará valores de C_i pequeños (Figura 9).

En la figura 9 se muestra el análisis del control de flujo para los dos modelos, el de difusión y colisión al azar (Figura 9A) y el de los supercomplejos (Figura 9B) en donde se utiliza a la antimicina A para inhibir al complejo III₂. Para el modelo de difusión y colisión al azar, se considera que la Q₁₀ se comporta como una poza homogénea, y es reducida por el Complejo I; el ubiquinol producido puede alimentar a cualquier complejo III₂ y eventualmente los electrones sirven para reducir al oxígeno molecular a través del complejo IV. La reducción del oxígeno molecular a partir de la oxidación del NADH se titula con la antimicina A (AA), un inhibidor específico del Complejo III₂. Aunque la AA inhibe una porción del Complejo III₂, el ubiquinol aún es oxidado por los Complejos III₂ activos, permitiéndose así el flujo de electrones hasta el oxígeno; esto se refleja en la gráfica como un retraso en la inhibición de la actividad respiratoria. Conforme se incrementa la concentración de AA y en consecuencia la cantidad de Complejo III₂

inhibidos, la curva muestra la disminución de la actividad respiratoria, hasta llegar al 100% de inhibición. Este tipo de curvas son características de enzimas consecutivas en una vía metabólica pero que no tienen interacción física o contactos entre ellas.

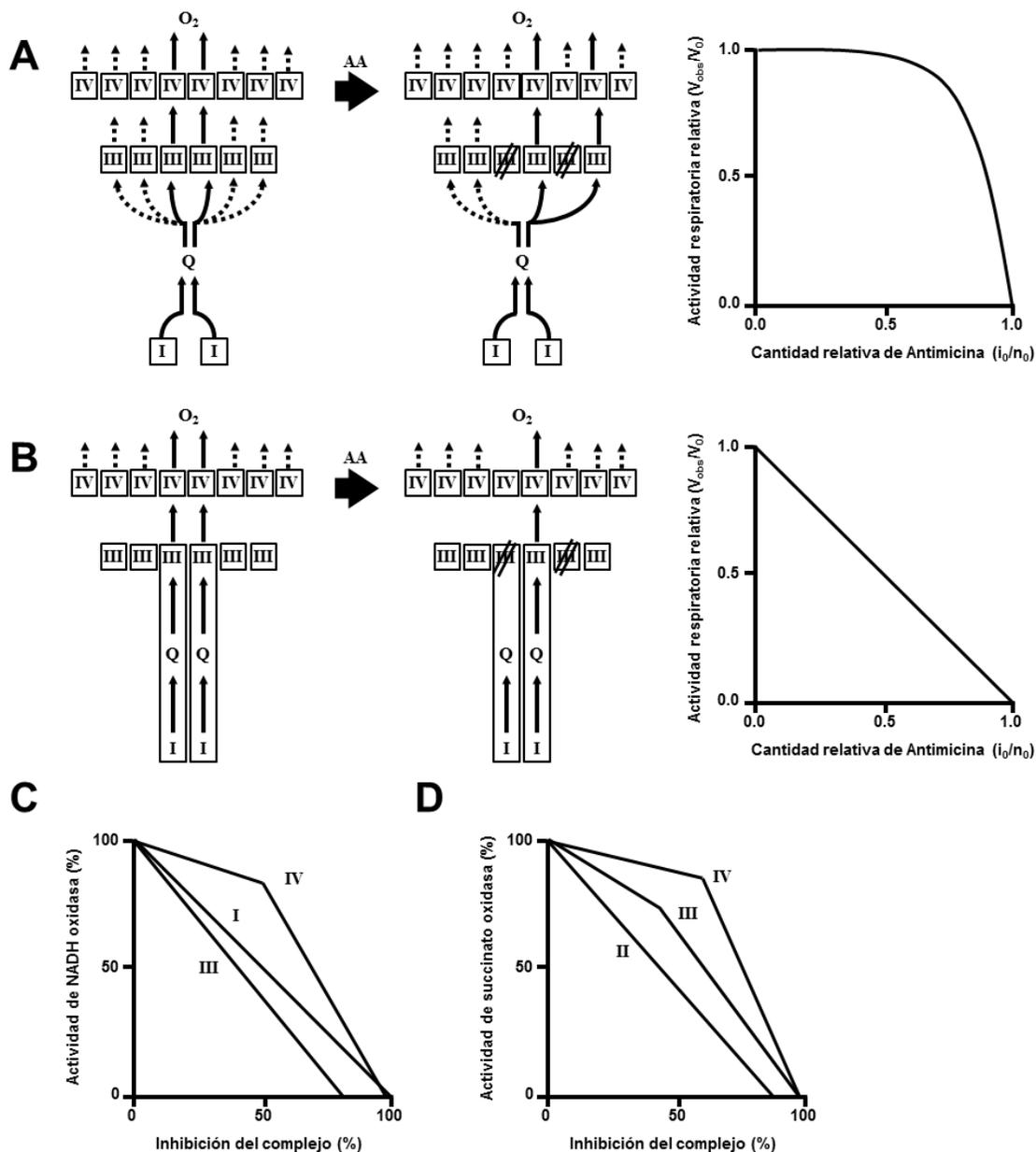


Figura 9. Modelos empleados para el análisis de control de flujo metabólico. A) se considera el comportamiento de la poza de quinona. La Q_{10} se muestra como un distribuidor de electrones que difunde libremente entre el Complejo I, el donador de electrones, y el Complejo III_2 , el aceptor de electrones. La inhibición del Complejo III_2 por la antimicina A (AA) produce una curva no lineal de inhibición para la oxidación del

ubiquinol. Esto se debe a que el ubiquinol puede ser oxidado por los complejos III₂ que permanecen activos (indicados por las líneas punteadas). B) Modelo de los supercomplejos para la transferencia de los electrones. La Q₁₀ no difunde libremente y su reducción-oxidación ocurre entre los complejos I y III₂ del supercomplejo; como resultado la AA produce una curva de inhibición lineal para el flujo de los electrones hasta el oxígeno. Análisis de control de flujo para el transporte de electrones por los complejos respiratorios mitocondriales de corazón de bovino. Los complejos fueron titulados con sus inhibidores específicos durante el flujo de los electrones desde el NADH (C) o el succinato (D). Las curvas se trazaron sobre los puntos experimentales (no mostrados para mejor claridad), y representan el porcentaje de la actividad residual del flujo de electrones (determinado como el consumo de oxígeno) en función del porcentaje de inhibición del Complejo I, el Complejo II, el Complejo III₂ y el Complejo IV, por la rotenona, la carboxina, la mucidina y el cianuro, respectivamente [Modificado de 46].

Al aplicar este enfoque al modelo sólido de la CTE (Figura 9B), se considera que existe la canalización del ubiquinol entre los complejos I y III₂. Al titular con AA la actividad del Complejo III₂ se observa un cambio inversamente proporcional entre la actividad respiratoria (reducción del oxígeno) y la proporción de Complejo III₂ inhibido. Este tipo de curvas son características de la asociación supramolecular de enzimas consecutivas de una vía metabólica.

A partir del análisis del control de flujo en las partículas submitocondriales del corazón de bovino se determinó que durante la oxidación del NADH, el Complejo I y el III₂ ejercen un $C_I = 1.06$ y de $C_{III} = 0.99$ respectivamente, lo que sugiere una estrecha interacción entre tales complejos [82] y la canalización del ubiquinol (Figura 9C). En condiciones experimentales similares, el Complejo IV tiene un $C_{IV} = 0.26$, lo que demuestra un bajo control de flujo y sugiere que puede estar distribuido azarosamente (Figura 9C). Sin embargo, el método empleado para obtener a las partículas submitocondriales puede alterar la estabilidad de los supercomplejos y provocar que el Complejo IV se separe. Aunado a esto, para la oxidación del succinato el Complejo II es el único paso limitante ($C_{II} = 0.88$, $C_{III} = 0.34$, $C_{IV} = 0.20$), mostrando claramente que no hay canalización del sustrato hacia los complejos III₂ y IV (Figura 9D) [46; Bianchi 2004, citado en 46].

Estructura de los supercomplejos

La estructura de los supercomplejos se ha dilucidado parcialmente gracias a la microscopía electrónica de partícula única. El grupo de Dudkina [83] presentó la proyección 2D del supercomplejo I₁-III₂ de las mitocondrias de planta, la cual mostró la forma de F desde la vista lateral, mientras que la vista superior mostró una forma triangular. Posteriormente, Schäfer [84] construyó el mapa 3D del supercomplejo I₁-III₂-IV₁ de corazón de bovino a partir del análisis de microscopía electrónica de inclinación cónica (Conical Tilt Electron Microscopy Analysis) de la tinción negativa. Las dimensiones del supercomplejo en el plano de la membrana son 28 nm X 24 nm, donde se observa una extensa interacción entre el Complejo III₂ y el brazo membranal del Complejo I, mientras que el Complejo IV interactúa con la porción distal del brazo (Figura 10A). Más aún, a partir de las reconstrucciones en 3D se puede ver que los sitios para la Q₁₀ y el citocromo c de los diferentes complejos dentro del supercomplejo están orientados, apoyando la hipótesis de la canalización de los sustratos con distancias cortas de difusión para estos acarreadores móviles de electrones (Figura 10B y C).

En contraste con estas observaciones, la misma Dudkina [85] presentó un nuevo mapa en 3D de alta resolución, que muestra la arquitectura del respirosoma de mamífero a nivel de la estructura secundaria, donde los complejos I, III₂ y IV tienen pocos contactos entre ellos. En particular, dentro de la membrana se observan espacios entre el Complejo III₂ y el IV, mientras que en la matriz, a nivel de la superficie de la membrana, estos complejos tienen mayor contacto (Figura 11). Simultáneamente, el grupo de Althoff [89] demostró que existen muy pocos puntos de contacto directo entre los complejos dentro de este supercomplejo debido a que las distancias promedio entre ellos exceden los 2 nm. Más aún, estos autores indican que, a una resolución de 19 Å, la región del supercomplejo que está embebida en la membrana muestra valores de densidad intermedios entre lo que se puede observar en una proteína soluble y el interior hidrofóbico de la membrana, por lo que sugieren que los complejos dentro del supercomplejo pueden mantenerse unidos, al menos en parte, por la interacción proteína-lípido. De igual manera, el espacio entre los complejos que está lleno de los lípidos de la membrana podría facilitar la difusión del ubiquinol entre el Complejo I y el III₂.

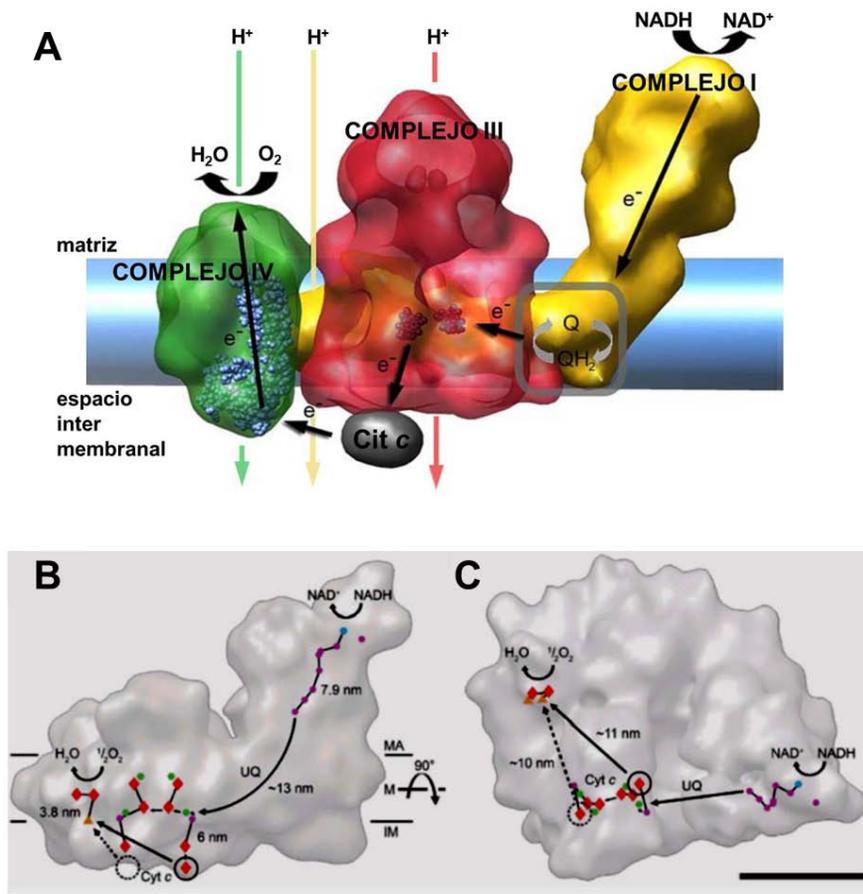


Figura 10. Ruta para la transferencia de los electrones en el super-complejo. A) Modelo del súper-complejo $I_1:III_2:IV_1$. En amarillo se muestra al complejo I, en rojo al complejo III_2 , en verde al complejo IV y en gris al citocromo c. Se muestra la ruta del flujo de los electrones y los sitios de bombeo de los protones [Modificado de 97]. Se muestra la vista lateral de la densidad electrónica del súper-complejo $I_1:III_2:IV_1$ a nivel de la membrana (B) y vista desde la matriz (C). En azul se muestra el FMN, en

purpura los centros hierro-azufre, en verde el sitio para la Q_{10} y la estigmatelina, en rojo los grupos hemo y anaranjado los átomos de cobre. La trayectoria de los electrones está marcada con flechas negras. Los círculos punteados señalan los sitios distales para la unión del citocromo c, los cuales se muestran vacíos en el super-complejo. MA = matriz; M = membrana interna; IM = espacio intermembranal o interior de la cresta; UQ = ubiquinol; Cyt c = citocromo c. La barra corresponde a 10 nm. [Modificado de 86].

Es importante hacer notar que los sitios de unión para el ubiquinol en el modelo de Althoff (Figura 10B y C) están convenientemente colocados para hacer eficiente la transferencia de los electrones, es decir, a una distancia de alrededor de 13 nm entre el Complejo I y uno de los monómeros del Complejo III_2 , mientras que el otro monómero está orientado hacia la fase lipídica de la membrana. Los autores proponen que la proximidad de uno de los monómeros del III_2 al Complejo I hace más eficiente la oxidación del ubiquinol, mientras que el monómero lejano es necesario para la transferencia de los electrones al citocromo c a través del dominio Rieske flexible, de acuerdo con el modelo propuesto por el grupo de Trumpower [88] para la actividad del Complejo III_2 . Sin embargo, esta propuesta

aún no aclara la canalización del ubiquinol producido por el Complejo I al monómero distal del Complejo III₂, para permitir el funcionamiento alternado de ambos monómeros.

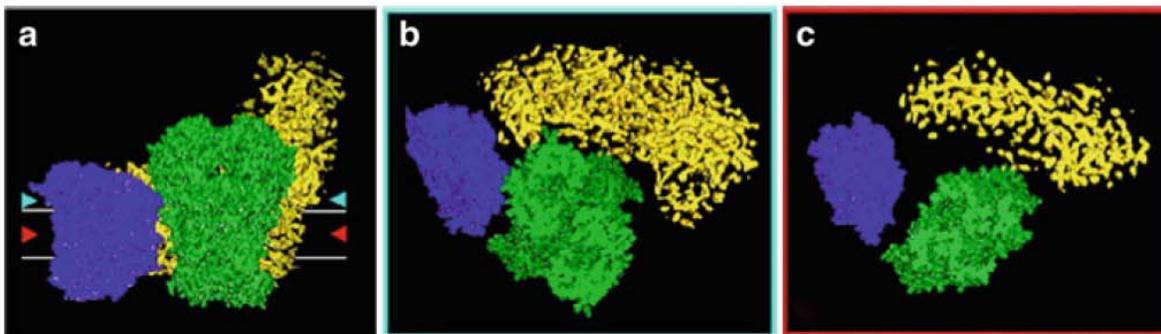


Figura 11. Ajuste de las estructuras de alta- y media-resolución de los complejos I, III₂ y IV en un mapa 3D de crio-microscopía electrónica del supercomplejo I₁:III₂:IV₁. a) Vista lateral desde el plano de la membrana del modelo espacial del respirosoma, las cabezas de flecha en rojo y azul claro indican el nivel de la sección mostrada en b y c respectivamente. Se muestra la sección del modelo espacial del respirosoma a nivel de la matriz (b) y a nivel de la membrana (c). Se observan espacios entre los complejos del supercomplejo. Se muestra la estructura cristalográfica de rayos-X del dímero del complejo III de bovino (con marco verde) y del monómero del complejo IV de bovino (con marco azul); el mapa de la densidad electrónica del complejo I de *Yarrowia lipolytica* se muestra en amarillo [Modificado 86].

Influencia de la interacción proteína-lípido en la conformación de los supercomplejos

Las proteínas integrales de membrana interactúan estrechamente con los lípidos en algo que se denomina anillo lipídico [89]. Si las proteínas de membrana se encuentran en baja concentración, éstas se dispersarán al azar en la membrana [Lee 2004, citado en 46], mientras que a altas concentraciones tienden a agregarse.

En la membrana interna mitocondrial, las proteínas integrales del sistema de la fosforilación oxidativa están tan densamente empaçadas, que se ha calculado que la distancia promedio entre los diferentes complejos es de pocos nanómetros [Lenaz 1998, citado en 46]; de tal suerte, que la presencia de asociaciones entre los complejos respiratorios no debería ser inesperada. Además, la difusión de las proteínas en el plano de la membrana se encuentra limitado por la presencia de los sitios de contacto entre la membrana interna y la

externa [90], y de las conexiones entre la membrana interna y la cresta [91] (Figuras 4 y 5).

Es claro que la alteración de la composición del anillo lipídico o en general de los lípidos de la membrana (cambio en la presencia o número de cargas electrostáticas, o en la longitud de la cadena del ácido graso) podrían alterar dramáticamente el comportamiento y función de la proteína, así como su interacción con otras proteínas. En este sentido, se ha determinado que la cardiolipina es esencial para la actividad de la citocromo oxidasa, los complejos I y III₂ [Fry 1981, citado en 46] y diversos acarreadores mitocondriales [92]. Asimismo, se ha observado que la cardiolipina estabiliza tanto a los complejos respiratorios como a los supercomplejos. En la cepa mutante $\Delta crd1$ de *S. cerevisiae*, la cual no puede producir cardiolipina, el supercomplejo III₂-IV₂ es significativamente menos estable que el supercomplejo de la cepa silvestre. Además, aunque se sobreproducen otros lípidos como la fosfatidil etanolamina y el fosfatidil glicerol, estos no sustituyen a la cardiolipina y no evitan que el 90% de los supercomplejos se disocien [93; Pfeiffer 2003, citado en 46]. También se ha reportado que la exposición de la mitocondria a las especies reactivas de oxígeno (ERO) afecta la actividad respiratoria al dañar a la cardiolipina [Petrosillo 2003, citado en 46] al remover dobles enlaces en posición *cis* de la cadena del ácido graso, produciendo grandes cambios biofísicos en la bicapa lipídica [94], así como el incremento del desorden y la posible eliminación de las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína [95]. Con ello se ha sugerido que la distorsión de la bicapa lipídica por la lipoperoxidación, en particular de la cardiolipina, puede determinar la disociación de los supercomplejos y afectar así la generación del $\Delta\Psi_m$.

Evidencias indirectas sugieren que el ensamblaje de los supercomplejos puede limitar la generación de superóxido durante el flujo de electrones y el consumo de oxígeno [96]. La hipótesis sostiene que en los respirosomas se mantiene el estado oxidado de todos sus componentes gracias a que se facilita el flujo de los electrones desde el NADH hasta el oxígeno, limitando así la formación de ERO. En este sentido, el Complejo I tiene dos posibles sitios para la reducción del oxígeno: el FMN y el centro hierro-azufre N₂. El FMN puede ser expuesto al oxígeno cuando el Complejo I es separado del III₂; en estas condiciones el Complejo I se desestabiliza haciendo que su subunidad de 51 kDa (que contiene al FMN) se haga más flexible e interaccione con el oxígeno [97]. Así, la pérdida de la organización de los supercomplejos puede estar involucrada en un ciclo vicioso de estrés oxidante y pérdida de energía.

Modificación covalente de los complejos

La fosforilación/desfosforilación y otros eventos postraduccionales de las proteínas, son factores importantes en su asociación/disociación, en las cascadas de señalización, en el ensamblaje del citoesqueleto y en la actividad de las enzimas. En este sentido, se ha reportado que en la mitocondria se encuentran diferentes cinasas y fosfatasas [98] involucradas en la modificación covalente de residuos de serina, treonina [99] y tirosina [100] de diferentes proteínas y de algunos complejos respiratorios. En particular, el Complejo I es fosforilado por una proteína cinasa A mitocondrial y desfosforilado por una fosfoproteína fosfatasa, con lo que se modifica su estabilidad, su actividad y su capacidad de generar ERO's [101, 102].

El supercomplejo de la F_1F_0 -ATP sintasa

Simultáneamente a la purificación y estudio de los complejos respiratorios, a mediados del siglo pasado se caracterizó al complejo traductor de la energía almacenada en el $\Delta\Psi_m$ en ATP, denominado F_1F_0 -ATP sintasa o Complejo V. Esta enzima se considera un nanomotor y se puede describir estructuralmente por un sector hidrofílico denominado F_1 y un sector hidrofóbico llamado F_0 ; funcionalmente se puede dividir en un rotor y un estator.

La F_1F_0 -ATP sintasa como dímero

Además de su papel bioenergético en la síntesis de ATP, se ha descrito que la F_1F_0 -ATP sintasa también desempeña un papel importante dentro de la arquitectura mitocondrial. En este sentido, en la última década se ha descrito que el complejo V puede formar homo-oligómeros, siendo los estados monoméricos y diméricos los más estudiados (Figura 8). Aunque aún se desconoce el papel bioenergético de los diferentes estados oligoméricos del complejo V, se ha demostrado que el dímero tiene un papel importante en la arquitectura de las crestas de la membrana interna mitocondrial (Figuras 5 y 12). Asimismo, se ha demostrado que las proteínas involucradas en la interacción monómero-monómero y la estabilidad del dímero son diferentes en cada sistema biológico.

El dímero de la F₁F₀-ATP sintasa en las algas

Chlamydomonas reinhardtii y *Polytomella sp* son algas clorofíceas o algas verdes; en éstas la F₁F₀-ATP sintasa presenta las subunidades homólogas α , β , γ , δ , OSCP, *a* y *c*. A pesar de que las subunidades catalíticas presentan alta similitud con el resto de las ATP sintasas, éstas tienen extensiones de aminoácidos; por ejemplo, la subunidad α cuenta con aproximadamente 20 aminoácidos en el amino terminal y la subunidad β contiene 60 aminoácidos extras en el extremo carboxilo terminal; aunque aún no es clara su función, se ha propuesto que podrían desempeñar un papel regulador de la actividad del complejo, ya que no se ha identificado el homólogo de la proteína inhibidora IF₁ [103].

Una característica estructural de este complejo es que no se identificaron homólogos de las subunidades clásicas que forman el estator de la ATP sintasa del resto de los eucariontes, ni aquellas involucradas en la dimerización del complejo; sin embargo, se identificaron 9 subunidades asociadas a la dimerización, las cuales no tienen similitud con otras proteínas y a las que se les denominó ASA (del inglés “ATP Synthase-Associated protein”) [104] (Figura 12A),

La F₁F₀-ATP sintasa de las algas se puede purificar como un dímero muy estable de aproximadamente 1600 kDa [104]. Para la obtención del monómero se han llevado a cabo cambios en la composición peptídica, lo que implica la disminución de la proporción de las subunidades que se han sugerido como dimerizadoras, la ASA6 y la ASA9 [104].

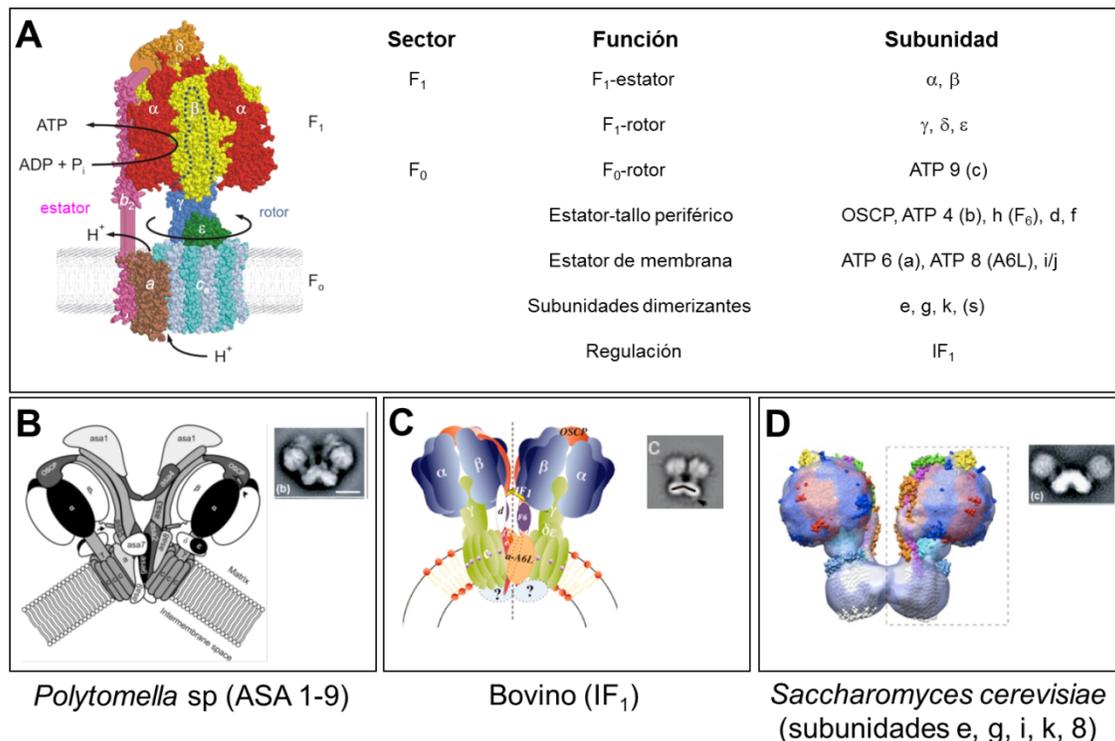


Figura 12. Estructura de la F₁F₀-ATP sintasa y los dímeros. A) Estructura, ubicación y función de las subunidades del Complejo V. Se muestra el flujo de los H⁺ a través del sector F₀, y la síntesis de ATP en el sector F₁. Modelo para los dímeros del complejo V en *Polytomella sp* (A), *Bos taurus* (B), y *Saccharomyces cerevisiae* (C). Se indican las proteínas involucradas en la asociación entre los monómeros para cada organismo. En los recuadros se muestra las micrografías [Modificadas de 104-106].

El dímero de la F₁F₀-ATP sintasa en los mamíferos

Con respecto a los mamíferos, el dímero más estudiado es el del corazón de bovino. Se ha reportado en la literatura que la subunidad IF₁ promueve la dimerización del complejo V [107] (Figura 12B); estructuralmente se ha demostrado que la dimerización es esencial para la biogénesis de las crestas de la membrana interna mitocondrial. Minauro-Sanmiguel y col. [105] resolvieron la estructura de la F₁F₀-ATP sintasa dimérica aislada de las mitocondrias de corazón de bovino. Se encontró que la interfase del dímero está formada por el contacto tanto del dominio F₁ como del F₀ y éstos a su vez conectados por la proteína IF₁ [105].

Campanella y col. [108] han demostrado que al eliminar la subunidad IF₁ se pierden los dímeros y simultáneamente la arquitectura mitocondrial se ve afectada;

en particular disminuye el número de crestas por mitocondria y por μm^2 . Aunado a esto, la muerte celular incrementa hasta en un 40%. Por el contrario, cuando se sobreexpresa a la subunidad IF_1 , se observa la protección celular contra el daño por isquemia, el aumento del dímero del complejo V y su actividad de síntesis de ATP.

Adicionalmente, se ha observado que la expresión de la subunidad IF_1 varía entre los diferentes tejidos y tipos celulares [55, 108]. En este sentido, se ha reportado que la diferenciación celular del citotrofoblasto en sinciotrofoblasto modifica la arquitectura mitocondrial por medio de la subexpresión de la subunidad IF_1 [55]. Durante la diferenciación del citotrofoblasto en sinciotrofoblasto las mitocondrias disminuyen su tamaño y cambian la arquitectura lamelar de sus crestas por una arquitectura vacuolar; simultáneamente las mitocondrias adquieren la capacidad de sintetizar progesterona, necesaria para preservar el embarazo.

El dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa en las levaduras

A diferencia de los dímeros de mamífero, el dominio de interacción entre los monómeros de *S. cerevisiae* es el sector F_0 [106]. Se ha determinado que las subunidades dimerizantes son las subunidades *e*, *g*, *k*, *i* y δ , gracias a experimentos que demuestran que una alteración en estos componentes desestabiliza las estructuras oligoméricas, lo que conduce a la aparición de especies monoméricas del Complejo V y morfologías anómalas en las crestas mitocondriales, a las que describen como aros de cebolla [41] (Figura 12C).

Como se puede observar, cada reino biológico ha desarrollado una estrategia para formar y/o estabilizar los dímeros del complejo V y plegar así la membrana interna mitocondrial en crestas. Por lo tanto, es importante ampliar el conocimiento sobre la composición del dímero de la F_1F_0 -ATP sintasa en otros organismos y determinar las subunidades dimerizantes. No obstante el desarrollo que ha tenido el análisis estructural y de la composición de los dímeros, es importante hacer notar que poco se ha hecho sobre el efecto que tiene la dimerización en la actividad de ATPasa del complejo V.

Hipótesis sobre el papel del dímero del Complejo V en la formación de la cresta

Las crestas están formadas por dos hojas de la membrana interna (MI), que están paralelas y muy próximas, dejando entre sí un espacio estrecho llamado lumen de la cresta (Figura 5). Estas hojas de MI están unidas en sus bordes formando puntas o cantos, en donde la bicapa lipídica se dobla con una curvatura positiva (aquí podría ser útil imaginarse una estructura similar a la cabeza o arco de una raqueta de tenis). En su base la cresta tiene forma tubular y se conecta a la membrana interna en una región conocida como frontera de la membrana interna (IBM de sus siglas en inglés). Estas conexiones están limitadas por las CJ y en ellas la bicapa lipídica tiene una curvatura negativa provocada por una proteína denominada Fcj1 (proteína formadora de la unión de cresta); estas CJ controlan la apertura de la cresta hacia el espacio intermembranal [40].

Se ha propuesto que la arquitectura de la cresta depende del equilibrio entre la concentración del dímero del Complejo V y la proteína Fcj1 [40]. Así pues, las puntas de las crestas y los cantos están formados por los dímeros del Complejo V, los cuales imponen una curvatura positiva a la membrana [40] y donde la proteína Fcj1 está ausente; por el contrario, en las CJ el dímero es virtualmente ausente, lo que permite la curvatura negativa de la membrana provocada por la presencia de la proteína Fcj1. La cara de la cresta contiene tanto a la proteína Fcj1 como al dímero del Complejo V, lo que puede determinar su forma plana (Figura 5). Una distribución balanceada de estas proteínas antagónicas (V_2 y Fcj1), puede también ser necesaria para la dinámica de fusión y fisión de las crestas. Aunque esta hipótesis trata de explicar la distribución dinámica del dímero del Complejo V y la proteína Fcj1, no se puede excluir que otros componentes tales como las prohibitinas, la proteína OPA1 u otros componentes que aún no se identifican, participen en la formación de las CJ o las puntas y cantos de las crestas.

La organización de los supercomplejos y del dímero del Complejo V ¿es rígida o flexible?

Como hemos visto, casi todo el Complejo I se encuentra asociado en supercomplejos, mientras que los complejos II, III₂ y IV se pueden encontrar incorporados en los supercomplejos, o difundir como complejos aislados. Debido a esto, se ha propuesto el *modelo de plasticidad* donde ambos tipos de organización

son posibles y funcionales, dependiendo del sistema mitocondrial o del estado fisiológico. En este modelo se incluyen las evidencias experimentales que sugieren que el flujo de electrones entre el Complejo I y el III₂ ocurre por la canalización del ubiquinol o microdifusión (al menos en mitocondrias de corazón de bovino y de hígado de rata), mientras que el flujo de electrones entre el Complejo II y el III₂ y entre el III₂ y el IV puede ocurrir gracias a las pozas de quinonas y del citocromo c, respectivamente. Asimismo, el rearrreglo de las crestas durante la regulación bioenergética de la mitocondria supone el cambio en la proporción dímero/monómero del complejo V. Todo ello encaminado a permitir la regulación, actividad y función de uno de los organelos celulares más fascinantes.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (IN214914, IN209614, IN211912) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Mercedes Esparza-Perusquía es estudiante de doctorado del Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM (511021118) y becaria del CONACyT (254400).

Bibliografía

1. Stryer, L., Berg, J.M., and Tymoczko, J.L. Capítulo 18, Fosforilación Oxidativa, Bioquímica, 7ª edición, Editorial Reverté, 2012.
2. Chávez, E., Flores-Herrera, O. y Martínez, F. Capítulo 23, Oxidaciones Biológicas y Bioenergética, Bioquímica de Laguna, 7ª edición, Laguna, J., Piña, E., Martínez, F., Pardo, J.P. y Riveros, H. (Editores), Manual Moderno, 2013.
3. Chávez, E., Flores-Herrera, O. y Martínez, F. Capítulo 22, Ciclo de los ácidos tricarboxílicos, Bioquímica de Laguna, 7ª edición, Laguna, J., Piña, E., Martínez, F., Pardo, J.P. y Riveros, H. (Editores), Manual Moderno, 2013.
4. Westermann B. (2002) *EMBO Rep.* **3**, 527-531.
5. Hayashi, Y., and Ueda, K. (1989) *J. Cell. Sci.* **93**, 565-570.
6. Griparic, L. and van der Bliek, A.M. (2001) *Traffic.* **2**, 235-244.
7. Okamoto, K., and Shaw, J.M. (2005) *Annu. Rev. Genet.* **39**, 503-536.
8. Marchi, S., Patergnani, S., and Pinton, P. (2014) *Biochim. Biophys. Acta.* **1837**, 461-469.
9. Jayashankar, V., and Rafelski, S.M. (2014) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **26C**, 34-40.
10. Scheffler, I.E. (2001) *Mitochondrion.* **1**, 3-31.

11. Parra, V., Verdejo, H., Del Campo, A., Pennanen, C., Kuzmicic, J., Iglewski, M., Hill, J.A., Rothermel, B.A., and Lavandero, S. (2011) *J. Bioenerg. Biomembr.* **43**, 47–51.
12. Hirokawa, N., and Takemura, R. (2005) *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 201–214.
13. Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005) *J Cell Sci.* **118**, 5411–5419.
14. Scalettar, B.A., Abney, J.R., and Hackenbrock, C.R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 8057–8061.
15. Germain, M., Mathai, J.P., McBride, H.M., and Shore, G.C. (2005) *EMBO J.* **24**, 1546–1556.
16. Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002) *Dev. Cell.* **2**, 55–67
17. Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003) *J. Cell. Biol.* **160**, 189–200.
18. Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., and Rojo, M. (2002) *Mol. Biol. Cell.* **13**, 4343–4354.
19. Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2006) *Cell.* **127**, 383–395.
20. Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., Ducommun, B., Lenaers, G., and Belenguer, P. (2002) *FEBS Lett.* **523**, 171–176.
21. Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A., and Rojo, M. (2005) *EMBO Rep.* **6**, 853–859.
22. Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 26185–26192.
23. Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacín, M., and Zorzano, A. (2005) *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1405–1415.
24. Soubannier, V., and McBride, H.M. (2009) *Biochem. Biophys. Acta.* **1793**, 154–170.
25. Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacín, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., and Zorzano, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 17190–17197.
26. Bossy-Wetzell, E., Barsoum, M.J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R., and Lipton, S.A. (2003) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **15**, 706–716.
27. Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J., and McNiven, M.A. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5409–5420.
28. Griffin, E.E., Graumann, J., and Chan, D.C. (2005) *J. Cell. Biol.* **170**, 237–248.
29. Kuzmicic, J., Del Campo, A., López-Crisosto, C., Morales, P.E., Pennanen, C., Bravo-Sagua, R., Hechenleitner, J., Zepeda, R., Castro, P.F., Verdejo, H.E., Parra, V., Chiong, M., and Lavandero, S. (2011) *Rev. Esp. Cardiol.* **64**, 916-923.
30. Mannella, C.A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**, 542–548.
31. Frey, T.G., Renken, C.W., and Perkins, G.A. (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* **1555**, 196-203.

32. Yu, T., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 2653–2658.
33. Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., and Shirihai, O.S. (2008) *EMBO J*. **27**, 433–446.
34. Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004) *Mol. Biol. Cell*. **15**, 5001–5011.
35. Zick, M., Rabl, R., and Reichert, A.S. (2009) *Biochim Biophys Acta*. **1793**, 5-19.
36. Mannella, C.A., Lederer, W.J., and Jafri, M.S. (2013) *J. Mol. Cell. Cardiol*. **62**, 51-57.
37. Wurm, C.A., and Jakobs, S. (2006) *FEBS Lett*. **580**, 5628–5634.
38. Chance, B., and Williams, G.R. (1956) *Adv. Enzymol*. **17**, 65-134.
39. Osman, C., Merkwirth, C., and Langer, T. (2009) *J. Cell. Sci*. **122**, 3823-3830.
40. Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Körner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W., Cyrklaff, M., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2009) *J. Cell Biol*. **185**, 1047–1063.
41. Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brèthes, D., di Rago, J.P., and Velours, J. (2002) *EMBO J*. **21**, 221-230.
42. Nijtmans, L.G., Artal, S.M., Grivell, L.A., and Coates, P.J. (2002) *Cell. Mol. Life Sci*. **59**, 143–155.
43. Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Lower, B., Wunderlich, F.T., von Kleist-Retzow, J.C., Waisman, A., Westermann, B., and Langer, T. (2008) *Genes Dev*. **22**, 476–488.
44. Merkwirth, C., and Langer, T. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*. **1793**, 27-32.
45. Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., and Gupte, S.S. (1986) *J. Bioenerg. Biomembr*. **18**, 331–368.
46. Lenaz, G., and Genova, M.L. (2007) *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. **292**, C1221–C1239.
47. Hochman, J., Ferguson-Miller, S., and Schindler, M. (1985) *Biochemistry*. **24**, 2509–2516.
48. Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2001) *J. Biol. Chem*. **276**, 37861–37867.
49. Wittig, I., Karas, M., and Schägger, H. (2007) *Mol. Cell. Proteomics*. **6**, 1215–1225.
50. Jung, C., Higgins, C.M. and Xu, Z. (2000) *Biochemistry*. **286**, 214–223.
51. Reifschneider, N.H., Goto, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Sugawa, M., Dencher, N.A., Krause, F. (2006) *J. Proteome. Res*. **5**, 1117–1132.
52. Lombardi, A., Silvestri, E., Cioffi, F., Senese, R., Lanni, A., Goglia, F., de Lange, P., and Moreno, M. (2009) *J. Proteomics*. **72**, 708–721.
53. Krause, F., Reifschneider, N.T.H., and Goto, S. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **329**, 583–590.
54. Colindres, M., Fournier C., Ritter, S., Zahnreich, S., Decker, H., Dencher, N., and Frenzel, M. (2007) *GSI Sci Rep*. 356.

55. De Los Rios-Castillo, D., Zarco-Zavala, M., Olvera-Sanchez, S., Pardo, J.P., Juarez, O., Martinez, F., Mendoza-Hernandez, G., García-Trejo, J.J., and Flores-Herrera, O. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 23911–23919.
56. Schäfer, E.R., Cellerino, A., Englert, C., Frenzel, M., Terzibasi, E., and Dencher, N.A. (2007a) *Ann. Conf. German. Genetic. Soc.* abstract **43**, 38.
57. Marques, I., Dencher, N.A., Videira, A., Krause, F. (2007) *Eukaryot. Cell.* **6**, 2391–2405.
58. Nübel, E., Wittig, I., Kerscher, S., Brandt, U., and Schägger, H. (2009) *Proteomics.* **9**, 2408–2418.
59. Brys, K., Castelein, N., Matthijssens, F., Vanfleteren, J.R., and Braeckman, B.P. (2010) *BMC Biol.* **8**, 91.
60. Le Pécheur, M., Morrow, G., Kim, H.J., Schäfer, E., Dencher, N., and Tanguay, R.M. (2009) Mitochondria in ageing and age-related disease, MiMage fi nal meeting (and LINK-AGE Topic Research) Group Meeting, abstract 16, p 35.
61. Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., and Braun, H.P. (2004) *Plant. Physiol. Biochem.* **42**, 937–942.
62. Krause, F., Reifschneider, N.H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S., and Dencher, N.A. (2004b) *J. Biol. Chem.* **279**, 48369–48375.
63. Schägger, H. (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* **1555**, 154–159.
64. Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., and Schägger, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 5000–5007.
65. Stuart, R.A. (2009) *Methods. Enzymol.* **456**, 191–208.
66. Blair, P.V., Oda, T., and Green, D.E. (1963) *Biochemistry.* **2**, 756–764.
67. Green, D.E., and Wharton, D.C. (1963) *Biochem Z.* **338**, 335–348.
68. King, T.E., Nickel, K.S., and Jensen, D.R. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 1989–1994.
69. Schwerzmann, K., Cruz-Orive, L.M., Eggman, R., Sängler, A., and Weibel, E.R. (1986) *J. Cell. Biol.* **102**, 97–103.
70. Mick, D.U., Wagner, K., van der Laan, M., Frazier, A.E., Perschil, I., Pawlas, M., Meyer, H.E., Warscheid, B., and Rehling, P. (2007) *EMBO J.* **26**, 4347–4358.
71. Sunderhaus, S., Dudkina, N.V., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M., Zabaleta, E., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 6482–6488.
72. Hashimoto, T., Hussien, R., Cho, H.S., Kaufer, D., and Brooks, G.A. (2008) *PLoS One.* **3**, e2915.
73. Persichini, T., Mazzone, V., Polticelli, F., Moreno, S., Venturini, G., Clementi, E., and Colasanti, M. (2005) *Neurosci, Lett.* **384**, 254–259.
74. Bisetto, E., Di Pancrazio, F., Simula, M.P., Mavelli, I. and Lippe, G. (2007) *Electrophoresis,* **28**, 3178-3185.
75. Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., and Braun, H.P. (2004) *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 937–942.
76. Dudkina, N.V., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2006) *Trends Plant Sci.* **11**, 232-240.
77. Kröger, A., and Klingenberg, M. (1973.) *Eur. J. Biochem.* **34**, 358–368.

78. Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., and Gupte, S.S. (1986) *J. Bioenerg. Biomembr.* **18**, 331–368.
79. Hackenbrock, C.R., and Hammon, K.M. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 9185–9187.
80. Kacser, A., and Burns, J.A. (1979) *Biochem. Soc. Trans.* **7**, 1149–1160.
81. Kholodenko, N.B., and Westerhoff, H.V. (1993) *FEBS Lett.* **320**, 71–74.
82. Lenaz, G., Fato, R., Formiggini, G., and Genova, M.L. (2007) *Mitochondrion.* **S8-33**.
83. Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 3225–3229.
84. Schäfer, E., Dencher, N.A., Vonck, J., and Parcej, D.N. (2007b) *Biochemistry.* **46**, 12579–12585.
85. Dudkina, N.V., Kudryashev, M., Stahlberg, H., and Boekema, E.J. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 15196–15200.
86. Althoff, T., Mills, D.J., Popot, J.L., and Kühlbrandt, W. (2011) *EMBO J.* **30**, 4652–4664.
87. Vonck, J., and Schäfer, E. (2009) *Biochim. Biophys. Acta.* **1793**, 117–124.
88. Castellani, M., Covian, R., Kleinschroth, T., Anderka, O., Ludwig, B., and Trumpower, B.L. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 502–510.
89. Hesketh, T.R., Smith, G.A., Houslay, M.D., McGill, K.A., Birdsall, N.J., Metcalfe, J.C., and Warren, G.B. (1976) *Biochemistry.* **15**, 4145–4151.
90. Brdiczka, D.G., Zorov, D.B., and Sheu, S.S. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.* **1762**, 148–163.
91. Mannella, C.A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.* **1762**, 140–147.
92. Houtkooper, R.H., and Vaz, F.M. (2008) *Cell. Mol. Life. Sci.* **65**, 2493–2506.
93. Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43553–43556.
94. Stark, G. (2005) *J. Membr. Biol.* **205**, 1–16.
95. Megli, F.M., and Sabatini, K. (2003) *Chem. Phys. Lipids.* **125**, 161–172.
96. Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Hemendinger, R., Greenamyre, J.T., and Rosenfeld, J. (2007) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **292**, C708–C718.
97. Radermacher, M., Ruiz, T., Clason, T., Benjamin, S., Brandt, U., and Zickermann, V. (2006) *J. Struct. Biol.* **154**, 269–279.
98. Thomson, M. (2002) *Cell. Mol. Life. Sci.* **59**, 213–219.
99. Horbinski, C., and Chu, C.T. (2005) *Free. Radic. Biol. Med.* **38**, 2–11.
100. Salvi, M., Brunati, A.M., and Toninello, A. (2005) *Free. Radic. Biol. Med.* **38**, 1267–1277.
101. Raha, S., Myint, A.T., Johnstone, L., and Robinson, B.H. (2002) *Free. Radic. Biol. Med.* **32**, 421–430.
102. Papa, S., De Rasmio, D., Scacco, S., Signorile, A., Technikova-Dobrova, Z., Palmisano, G., Sardanelli, A.M., Papa, F., Panelli, D., Scaringi, R., and Santeramo, A. (2008) *Biochim. Biophys. Acta.* **1777**, 719–728.
103. Villavicencio-Queijeiro, A., Vázquez-Acevedo, M., Cano-Estrada, A., Zarco-Zavala, M., Tuena de Gómez, M., Mignaco, J.A., Freire, M.M., Scofano, H.M.,

- Foguel, D., Cardol, P., Remacle, C., and González-Halphen, D. (2009) *J. Bioenerg. Biomembr.* **41**, 1–13.
104. Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C., and González-Halphen, D. (2006) *J. Bioenerg. Biomembr.* **38**, 271-282.
105. Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., García, J.J. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 12356-12358.
106. Couoh-Cardel, S., Uribe-Carvajal, S., Wilkens, S. and García-Trejo, J.J. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 36447-36455.
107. Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., and Walker, J.E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28353-28355.
108. Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M.R., Abramov, A.Y., Tinker, A., and Duchon, M.R. (2008) *Cell Metab.* **8**, 13-25.

Semblanza del Dr. Oscar Flores Herrera



El Dr. Oscar Flores Herrera es Biólogo por la Facultad de Ciencias-CU (1992), Maestro y Doctor en Investigación Biomédica Básica por la UACPyP-UNAM en 1996 y 2001, respectivamente. Actualmente es Profesor Titular A, TC (PRIDE C) en el Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina, UNAM, donde ha impartido la materia de bioquímica desde hace 23 años; simultáneamente ha participado en 26 cursos de posgrado dentro de la UNAM. Ha dirigido 2 tesis de licenciatura y 2 de maestría y actualmente dirige 1 de doctorado. Fue miembro del Comité Organizador de los Talleres de Actualización Bioquímica XXX, XXXI, XXXII y XXXIII entre el 2003 y el 2006; fue editor de los libros Mensaje Bioquímico XXVII, XXVIII, XXIX y XXX del 2003 al 2006. Su línea de investigación versa sobre la bioenergética de la mitocondria el estudio y caracterización cinética de los complejos y supercomplejos respiratorios y su relación con la arquitectura mitocondrial del basidiomiceto *Ustilago maydis*. Así mismo, estudia la síntesis de progesterona de las mitocondrias de la placenta humana. Su trabajo experimental se ha publicado en 22 artículos internacionales y en 2 capítulos en libros internacionales. Así mismo ha publicado 4 capítulos en libros nacionales. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde 1997, actualmente en el Nivel 1; es miembro de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. desde el 2004 y coordinador de investigación en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM desde el 2013.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 239-252, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

LA RESPUESTA ADAPTATIVA AL ESTRÉS DEL RETICULO ENDOPLASMICO Y LA REPLICACION DEL VIRUS DENGUE. EN LA SALUD COMO EN LA ENFERMEDAD

DENGUE VIRUS REPLICATION AND THE ADAPTATIVE RESPONSE TO STRESS OF THE ENDOPLASMATIC RETICULUM. IN HEALTH AS IN DISEASE

Karla Javonny Sepúlveda Salinas^{1,2} y José Ramos Castañeda¹

¹Instituto Nacional de Salud Pública, México. ²Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM. México.

Universidad No. 655 Colonia Santa María Ahuacatlán, Cerrada Los Pinos y Caminera C.P. 62100, Cuernavaca, Mor. México. Tel. (777) 329 3000

Resumen

El retículo endoplásmico (RE) es el compartimiento celular con la capacidad de detectar la síntesis y el correcto plegamiento de los polipéptidos que continuarán su tráfico por la vía secretoria, cualquier cambio en el poder de plegamiento provoca una sobrecarga de proteínas. El mecanismo celular que permite la adaptación de la célula a ésta sobrecarga se conoce como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), el UPR se encuentra altamente conservado entre

las especies. En los metazoarios 3 proteínas sensoras transmembranales residentes en el RE: ATF6, IRE-1 y PERK son las encargadas de transmitir las señales del citosol al núcleo. Estas tres vías se encuentran reguladas por la chaperona BiP/GRP78, la cual se encuentra asociada de manera constitutiva a estas proteínas; en respuesta al incremento en las proteínas mal plegadas BiP se disocia de las mismas, lo que provoca la homodimerización de PERK e IRE1 activando sus funciones de cinasa y endoribonucleasa respectivamente, generando múltiples señalizaciones. En el caso de ATF6 esta disociación permite su translocación al Golgi donde es procesado, convirtiéndose en un factor de transcripción activo. La manera en que estos tres sensores logran restaurar la homeostasis es atenuando la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de eIF2a, e incrementando la capacidad de plegamiento y degradación de las proteínas mediante el splicing de XBP1 y la transcripción de distintos genes. En caso de no resolverse el defecto en el plegamiento, dependiendo la célula y el estímulo, podría desencadenarse la apoptosis. El UPR es esencialmente igual en términos de la mecánica molecular en todos los organismos aunque sus consecuencias son diferentes; de particular interés es la relación que hay entre UPR e inmunidad innata ya que en organismos que no tienen inmunidad adaptativa como el mosquito vector del dengue, la defensa contra agentes infecciosos recae completamente en la inmunidad innata. Se sabe que en mamíferos, la activación de ATF6 controla la transcripción de genes de las llamadas proteínas de fase aguda y la de PERK activa la vía de señalización JNK/Nfkb que controla la transcripción de genes relacionados a la respuesta antiviral y a la apoptosis. En el contexto de la infección con el virus Dengue existen indicadores de la activación del UPR, por ejemplo la inducción de síntesis de membranas internas, adicionalmente conocemos que las proteínas NS4b y NS5 del virus Dengue bloquean la vía del interferón, lo que a su vez inhibe la transcripción de PERK. En relación a la infección en mosquitos sabemos que, al igual que en mamíferos, hay una activación del UPR pero se desconoce la relación que hay entre UPR como parte de la inmunidad innata y la infección viral en estos organismos, por lo que consideramos el estudio de ésta relación un conocimiento innovador que podría tener una aplicación práctica en el control de la transmisión del virus.

Palabras clave: (Dengue virus, UPR, Retículo endoplásmico, mosquito, estrés)

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is the cellular compartment with the ability to sense the synthesis and correct folding of polypeptides to continue their flux through the secretory pathway, any change in the appropriate folding causes excessive protein load. The cellular mechanism that allows adaptation of the cell to this overload is known as unfolded protein response (UPR). UPR is highly conserved among species. In metazoan the UPR is signaled through three ER transmembrane protein sensors: ATF6, IRE -1 and PERK. Each sensor transmits signals from the cytosol to the nucleus, these three pathways are regulated by the chaperone BiP/GRP78, which is constitutively associated with these proteins, in response to an increase in misfolded protein BiP dissociates from them, causing PERK and IRE1 homodimerization, activating their kinase and endoribonuclease functions respectively and generating multiple signals. This dissociation allows ATF6 translocation to the Golgi where it is processed, becoming an active transcription factor. The mechanisms used by these three sensors to restore homeostasis act by reducing protein synthesis through phosphorylation of eIF2 α and increasing the ER protein folding and degradative capacities through transcriptional activation by XBP1 and transcription from different genes. If the UPR cannot resolve the protein-folding defect, depending on the cell line and the stimulus, the cell undergo apoptosis. The UPR is essentially the same in terms of molecular mechanics in all organisms although its consequences are different. Of particular interest is the relationship between UPR and innate immunity, in organisms that do not have adaptive immunity such as the Dengue virus vector mosquito, in which the defense against infectious agents depends entirely on innate immunity. It is known that in mammals, the activation of ATF6 controls the transcription of acute inflammatory response genes and the axis of PERK activates the JNK/Nfkb pathway which controls the transcription of genes related to the antiviral response and apoptosis. In the context of Dengue virus infection, there are indicators of UPR activation, for example induction of synthesis of ER membranes, additionally it is well known that the NS4b and NS5 proteins of Dengue virus block interferon signaling, which in turn inhibits PERK transcription. In regards of infection in mosquitoes we know that, as in mammals, there is an activation of the UPR, but the relationship between UPR as part of innate immunity and viral infection in these organisms is unknown, so we consider the study of this relationship as an innovative knowledge that could have practical application in the control of virus transmission.

Keywords: (Dengue virus, UPR, Endoplasmic reticulum, stress, mosquito)

Introducción

El estrés celular es un fenómeno ampliamente estudiado. Los tipos de éste son diversos y las consecuencias se manifiestan en diversas escalas, desde lo subcelular hasta lo sistémico.

En particular, el estudio del estrés inducido por la infección viral ha devenido en el descubrimiento de fenómenos complejos de interacción entre vías con evidente impacto en la replicación viral, tanto deletéreas para el virus como para la célula infectada o el organismo en su conjunto.

Aunque el estrés celular inducido por la infección viral dispara mecanismos homeostáticos en todos los compartimentos celulares, dado el hecho de que la replicación viral impone una carga adicional y, en muchas ocasiones excesiva, a la síntesis de proteínas, el retículo endoplásmico (RE) es un compartimento especialmente sensible a la infección.

El lumen del RE, dada su función, contiene una concentración tan alta de proteínas que se considera un cuasi-gel; por ello, el aumento en la concentración de éstas y el tiempo en que una proteína es retenida en este compartimento, son cruciales para modular la homeostasis del RE y de la vía secretoria de la célula en su conjunto. El tiempo de residencia, entonces, depende de que tan rápido la proteína alcance su plegamiento funcional. Así pues, las actividades relacionadas con el plegamiento de las proteínas son clave para aliviar el estrés causado por una sobrecarga de proteínas en el RE.

Durante la década de 1980 el fenómeno se relacionó a la sobre-expresión de las llamadas proteínas de choque térmico, en particular con la, en ese tiempo llamada HSP70. Básicamente se observaba que durante diferentes situaciones de sobrecarga del RE, por ejemplo, la acumulación de proteínas mutantes o la infección viral, la concentración de HSP70 aumentaba. Uno de los debates fundamentales en este contexto, consistió en determinar cuál era el mecanismo molecular que promovía el aumento en la expresión de HSP70. Goff y Goldberg sugirieron que la información necesaria para inducir el aumento en la concentración de HSP70 se encontraba en la proteína misma, específicamente en su plegamiento [1]; la evidencia experimental fue proporcionada por Parcell y Sauer trabajando en bacterias, aunque rápidamente se extendió el concepto a todas las células[2]. Así pues, descrito como un mecanismo de regulación de la expresión de un grupo específico de proteínas, la llamada respuesta a las proteínas mal plegadas[3], está vinculada con fenómenos tan diversos como la

respuesta inmune, la obesidad/diabetes, neuropatologías crónicas, la infección viral, etc.

En este breve trabajo, se describirá la respuesta a las proteínas mal plegadas en el contexto de la infección por el virus Dengue y se hará énfasis en las consecuencias que este mecanismo tiene en la homeostasis de los insectos vectores y no vectores.

La Respuesta a las Proteínas Mal Plegadas.

El control de la carga de proteínas en el RE de las células eucariontes reside en gran medida en la capacidad de este compartimento de detectar las necesidades de plegamiento de los polipéptidos que están sintetizándose ya que una vez alcanzada su conformación funcional, los polipéptidos pueden salir del RE y continuar su tráfico por la vía secretoria de la célula; cualquier cambio en el requerimiento de poder de plegamiento ya sea este fisiológico o patológico, provoca una sobrecarga de proteínas en el RE, que, de no ser aliviado, lleva a la muerte de la célula por apoptosis[4]; el mecanismo celular que permite la adaptación de la célula a la sobrecarga del RE se conoce como respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR, unfolded protein response). El UPR está implicado en una variedad de procesos tanto fisiológicos como patológicos en el humano y en general en todos los mamíferos [5], así como en plantas[6], nematodos[7] e insectos[8]. En estos organismos, el UPR es esencialmente igual en términos de la mecánica molecular aunque sus consecuencias son diferentes; de particular interés es la relación que hay entre UPR e inmunidad innata ya que el objeto de estudio es el mosquito vector del dengue, en este sentido se sabe que en mamíferos la activación de uno de los brazos sensores del UPR controla la transcripción de genes de las llamadas proteínas de fase aguda[9], aunque su importancia en el contexto de alguna infección aún es motivo de estudio en parte porque el sistema inmune de los mamíferos es complejo, en organismos que no tienen un sistema inmune adaptativo, la defensa contra agentes infecciosos recae completamente en la inmunidad innata; en este contexto, la participación del UPR parece ser importante en *C. elegans*[10], *D. melanogaster*[11] y sólo hasta recientemente se ha estudiado en *N. tabacum*[12]. En mosquitos prácticamente nada se sabe sobre el UPR en general, aunque existen los ortólogos de las proteínas sensoras y efectoras anotadas en los genomas de *Aedes aegypti* y *Anopheles gambiae* [<http://www.vectorbase.org/index.php>].

El sistema del UPR está compuesto de tres proteínas residentes en el RE: ATF6, Ire1 y PERK, las funciones de cada una de estas proteínas están conservadas en la mayoría de los eucariontes. Desde la identificación de IRE1 como el primer gen relacionado a la respuesta de estrés en el RE en las levaduras, los mecanismos moleculares, incluidos los de ATF6 y PERK, han sido descritos usando levaduras y mamíferos. [13].

ATF6 es un factor de transcripción que se sintetiza como un propéptido que es retenido en el RE, en éste se asocia con la chaperona BiP/GRP78, esta interacción mantiene retenido a ATF6 en el RE, en cuanto se acumulan polipéptidos mal plegados, BiP/GRP78 se disocia de ATF6 permitiendo su migración al Golgi, donde es procesado por un par de proteasas, S1P y S2P las cuales liberan la porción citoplásmica de la proteína, ésta es transportada al núcleo donde se une a secuencias consenso ERSE II (CCAAT-N9-CCACG) y UPRE (TGACGTGC/A) las cuales controlan la transcripción de los genes de las chaperonas de RE[4, 14]; en mamíferos, se han descrito proteínas relacionadas a ATF6 que tienen el mismo comportamiento, pero que su expresión es tejido específica y con ello la expresión de genes, por ejemplo, en el hepatocito se expresan ATF6 y CREBH, estas dos proteínas son activadas, de la manera descrita anteriormente, pero el blanco en el genoma de CREBH es el UPRE, mientras que el de ATF6 es el ERSE II, de esta forma los genes blanco de ATF6 son los relacionados a la capacidad de plegamiento, mientras que los genes blanco de CREBH son los relacionados a los de las proteínas de fase aguda[9]; lo anterior sugiere que pueden existir proteínas de la misma familia de ATF6 que cumplan funciones específicas dependiendo del origen celular.

Ire1 es una endonucleasa cuya función principal es el procesamiento del mRNA del gen XBP1, el cual, en condiciones basales, codifica para una proteína de aproximadamente 33 kDa que es inactiva en términos de su actividad de control transcripcional, pero que al activarse Ire1, la actividad endonucleasa de RNA remueve una secuencia no codificante de aproximadamente 26 nucleótidos en mamíferos y hasta 53 en *D. melanogaster*[4, 15], esto extiende el marco de lectura para producir una proteína de 54 kDa con la actividad de factor de transcripción, el cual tiene como blancos en el genoma el ERSE II y el UPRE, aunque el juego de genes transcripcionalmente regulados difiere sustancialmente de aquellos regulados por ATF6, estos incluyen actividades que participan en el fenómeno de degradación de proteínas asociada al RE (ERAD, por sus siglas en inglés) y actividades pro apoptóticas como el factor de transcripción CHOP[4, 16]; la activación de Ire1 es similar a la de ATF6 en el sentido de que es la disociación de BiP/GRP78 lo que dispara la homodimerización y la autofosforilación

requeridas para activar su actividad función de endonucleasa[4]; Ire1 tiene otros mRNAs blanco y actualmente se está investigando la trascendencia de esta actividad[17].

El tercer sensor del UPR es la cinasa activada por estrés de RE PERK, esta cinasa pertenece a la familia de cinasas del factor de inicio de la traducción eIF2 α , todas ellas fosforilan a eIF2 α en la posición serina 51, esto evita el intercambio GDP/GTP y la disociación del factor eIF2 β , lo cual “secuestra” este componente del complejo ternario tRNA^{Met}/eIF2 α /GTP por lo que la traducción de proteínas de la célula se atenúa[18], las otras cinasas son GCN2 (cinasa inducida por falta de aminoácidos), PKR (cinasa inducida por RNAs/Interferón) y HRI, la cual es específica de eritrocitos (cinasa inducida por reducción en el grupo hemo), estas últimas son específicas de los cordados, mientras que PERK y GNC2 están presentes en todos los animales[19]; la activación de PERK es similar a la de Ire1, esta cinasa también se dimeriza y autofosforila, la disminución en el complejo ternario permite la traducción a partir de un ORF corriente abajo del ORF autentico del mRNA de ATF4 lo que produce una proteína con actividad de factor de transcripción la cual tiene como blanco en el genoma promotores de la familia CCAAT[4, 20] que tienen funciones diversas en el metabolismo celular y el balance de óxido-reducción; una función importante en la inmunidad innata de PERK es la activación de la vía de señalización JNK/NF-kB que controla la transcripción de genes relacionados a la respuesta antiviral y a la apoptosis[21], esto sugiere que en organismos donde no se cuenta con un sistema de inmunidad adaptativa, como son los insectos, la activación de PERK, directa o indirectamente, puede estar involucrada en la defensa antiviral.

Se ha debatido mucho si el UPR tiene como fin proteger a la célula de los efectos deletéreos de la sobre carga del RE o si es un mecanismo que dirige a la célula a la muerte por apoptosis[22], sin embargo, actualmente se piensa que el balance entre adaptación y apoptosis depende tanto del estímulo de estrés como de la célula en cuestión[23, 24], especialmente en situaciones de estrés crónico, como sería el caso de la infección viral. En este contexto, virus con genomas de DNA y RNA modulan el UPR ya sea por la sobre carga que impone la síntesis de proteínas virales o porque la formación del virión se lleve a cabo en el lumen del RE[25]; en particular, virus de importancia en la salud pública como Coronavirus[26, 27], Hepatitis B[28], Hepatitis C[29], West Nile[30] y VD[31], modulan de diversas maneras el UPR de las células de mamífero. No está demás decir que nada se sabe de la relación entre UPR e infección viral en insectos, aunque es de suponerse que dado que el UPR tiene características conservadas,

la mecánica molecular debe ser muy parecida, aunque las consecuencias deben ser diferentes.

El VD pertenece a la familia Flaviviridae, género Flavivirus; es un virus envuelto de aproximadamente 40 nm de diámetro y tiene un genoma de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 11 Kb; el genoma está constituido en su extremo 5' por una estructura de Cap tipo I a la que le sigue una región no traducida de aproximadamente 100 bases, a esta región le sigue un marco de lectura abierto que codifica para tres proteínas estructurales, de cápside, C, pre-membrana/membrana, preM/M y la proteína de envoltura E, después le siguen las proteínas no estructurales NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5; el genoma se completa con una región 3' no traducida de aproximadamente 500 bases sin cola de poliA[32]. El ciclo replicativo del VD inicia cuando el virión se une a la membrana celular mediante un receptor o receptores de membrana, la naturaleza de este receptor, aunque se asume que es proteína, no ha sido del todo establecida, nuestro grupo de investigación descubrió un receptor de 65 kDa en la membrana de células neurogénicas de ratón[33-36], pero han sido descritas otras moléculas en células epiteliales de diversas especies de mamífero, células dendríticas humanas[37] y en células de mosquito[38, 39]. Luego de la unión a la membrana de la célula, el virión es internalizado mediante endocitosis en vesículas no cubiertas de clatrina[40], aunque evidencia reciente muestra que en el caso de la internalización del virión en células de mosquito, las vesículas endocíticas están revestidas de clatrina[41, 42]; las vesículas que contienen al virus, en su tráfico al RE, disminuyen su pH interno de tal suerte que cuando se alcanza un pH aproximado de 6 la proteína E cambia de conformación de un dímero a un trímero y esta conformación permite la exposición del péptido de fusión viral y la fusión de la membrana viral y vesicular liberando la nucleocápside que inmediatamente se desensambla para liberar el genoma muy cerca de los ribosomas del RE[40]. La replicación viral inicia por la traducción de genoma parental, dando lugar a una poliproteína que es procesada por proteasas virales y celulares de tal forma que se producen las actividades virales requeridas para la síntesis de la hebra molde negativa del genoma y las proteínas estructurales para empacar el virión[43]. El virión se forma en el RE y viaja a través de la vía secretoria de la célula hasta un compartimento de la red Trans Golgi donde el péptido preM es removido por la acción de una proteasa parecida a furina[40]. Aunque existen algunas diferencias, se asume que el ciclo replicativo del VD en células de mosquito, está esencialmente conservado.

El efecto de la replicación viral en la célula infectada ha sido ampliamente documentado a nivel ultraestructural tanto en células de mosquito como en células de mamífero, en ellas la infección induce la síntesis de membranas internas[44], de hecho, se ha sugerido que en la replicación de Flavivirus se forma un compartimento especial donde se lleva a cabo el empaquetamiento del virión[45, 46]; este fenómeno es un indicador de la activación del UPR[47], de hecho, la vía de Ire1 está activa durante la infección de células neurogénicas de ratón N18 y al eliminarla por medio de iRNA disminuye sustancialmente la expansión del RE[31]; en la activación de la vía de Ire1 parece estar involucrada la proteína NS2B, aunque se desconoce el mecanismo[31].

En relación a la infección en mosquitos, tenemos evidencia preliminar de que en células C6/36 el VD dispara la transcripción del gen y la acumulación de la chaperona Calreticulina, lo cual interpretamos como un indicador de activación del UPR. Otro aspecto relevante de la respuesta fisiológica celular a la infección y que de alguna manera tiene que ver con el UPR es el bloqueo de la señal de interferón de tipo 1 (IFN) por la proteína NS4B[48], la expresión de esta proteína bloquea la translocación del factor de transcripción STAT1 y se asume que toda la vía de señalización está bloqueada; un blanco probable es la actividad de PKR ya que esta enzima es inducida por IFN y por activación de receptores tipo Toll[49], la vía de transducción de señales derivada de la actividad de PKR es la activación de NF-kB, entonces, si NS4B (o cualquier otra proteína viral) impide la actividad de PKR, la señal de IFN se bloquea.

Ya se mencionó que PERK es una cinasa de la misma familia que PKR y que además su activación está vinculada a la cascada JNK/NF-kB, entonces, es razonable pensar que en el contexto del disparo del UPR por la infección viral, la actividad de PERK este de alguna forma inhibida. En favor de esta hipótesis, está el hecho de que la infección viral cursa sin bloqueo de la síntesis de proteínas celulares [32], así que si la infección dispara el UPR como ha sido demostrado, ¿porqué no se detecta la atenuación de la síntesis de proteínas inducida por la activación de PERK? Resultados preliminares obtenidos por este grupo demuestran que la activación de UPR por Tunicamicina previa a la infección por VD de células HeLa bloquea la replicación por completo, ya que se sabe que la activación de Ire1 no altera la replicación viral[31] y que la activación de ATF6 no tiene ningún componente que pudiera tener actividad antiviral (aunque probablemente este involucrado en la expresión de citocinas inflamatorias como TNF α o IL-6), nosotros interpretamos este resultado como que la actividad de PERK ya sea por atenuación de la síntesis de proteínas previa a la infección o por la activación de la vía JNK/NF-kB establece un estado refractario a la infección

(descartamos la posibilidad de aberraciones en la morfogénesis del virus inducida por la falta de glicosilación de proteínas ya que se juzgó la replicación por la presencia del intermediario replicativo).

La actividad de PERK en relación al estrés oxidativo podría tener importancia en la defensa innata a la infección viral mediada por ON[50]; la actividad antiviral del ON en infecciones por VD ha sido documentada en células de mamífero y de mosquito[51,52], aparentemente el ON tiene como blanco el complejo replicativo viral, pero no se tiene claro qué componente es el afectado; nuestro grupo recientemente demostró la actividad antiviral del ON en mosquitos vectores y no vectores de DV[53], el resultado importante es que el mosquito susceptible a la infección no produce ON, mientras que el refractario produce cantidades considerables de ON, no sabemos cómo se induce la producción de ON pero resulta provocativo especular que el VD en los diferentes mosquitos modula la expresión de la iNOS mediante un mecanismo dependiente de PERK por su vinculación con NF- κ B.

Por lo anterior, consideramos que el estudio del UPR en el contexto de la infección por DV de células de mosquito resultará en un conocimiento innovador no sólo por su relación con el estudio de las relaciones virus-célula en general o la mecánica de este proceso fisiológico en un organismo sin inmunidad adaptativa; además, creemos que algunos resultados de este estudio podrían tener una aplicación práctica en el control de la transmisión de una virosis de importancia nacional e internacional, específicamente, dado que el UPR tiene un componente de control transcripcional a través de ATF6 o XBP1, la activación específica de promotores dependientes de estos factores podría controlar la generación de un RNA interferente dirigido contra el virus. Actualmente esta aproximación se ha llevado a cabo utilizando un promotor sensible a la alimentación por sangre[54] y aunque el mosquito transgénico parece estable, el costo de sintetizar el siRNA aún en ausencia de virus (dado que no todos los humanos de los que se alimentara el mosquito podrían estar infectados) podría ser deletéreo, entonces, un promotor de un gen celular que responda a la infección como sería el de Calreticulina que, como ya se mencionó responde a la infección, podría mejorar esta situación.

Bibliografía

1. Goff, S. A., and Goldberg, A. L. (1985) *Cell* **41**, 587-595
2. Parsell, D. A., and Sauer, R. T. (1989) *Genes Dev* **3**, 1226-1232
3. Gething, M. J., and Sambrook, J. (1992) *Nature* **355**, 33-45

4. Schroder, M., and Kaufman, R. J. (2005) *Annu Rev Biochem* **74**, 739-789
5. Zhang, K., and Kaufman, R. J. (2006) *Neurology* **66**, S102-109
6. Vitale, A., and Boston, R. S. (2008) *Traffic* **9**, 1581-1588
7. Shen, X., Ellis, R. E., Sakaki, K., and Kaufman, R. J. (2005) *PLoS Genet* **1**, e37
8. Ryoo, H. D., and Steller, H. (2007) *Cell Cycle* **6**, 830-835
9. Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D. T., Back, S. H., and Kaufman, R. J. (2006) *Cell* **124**, 587-599
10. Haskins, K. A., Russell, J. F., Gaddis, N., Dressman, H. K., and Aballay, A. (2008) *Dev Cell* **15**, 87-97
11. Greene, J. C., Whitworth, A. J., Andrews, L. A., Parker, T. J., and Pallanck, L. J. (2005) *Hum Mol Genet* **14**, 799-811
12. Tateda, C., Ozaki, R., Onodera, Y., Takahashi, Y., Yamaguchi, K., Berberich, T., Koizumi, N., and Kusano, T. (2008) *J Plant Res* **121**, 603-611
13. Ng, D. T., Spear, E. D., and Walter, P. (2000) *J Cell Biol* **150**, 77-88
14. Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2001) *Mol Cell Biol* **21**, 1239-1248
15. Yoshida, H. (2007) *Antioxid Redox Signal* **9**, 2323-2333
16. Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D. (2002) *Nature* **415**, 92-96
17. Hollien, J., and Weissman, J. S. (2006) *Science* **313**, 104-107
18. Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000) *Mol Cell* **5**, 897-904
19. Dever, T. E. (1998) *Methods Mol Biol* **77**, 167-178
20. Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1990) *EMBO J* **9**, 1897-1906
21. Deng, J., Lu, P. D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Sonenberg, N., Harding, H. P., and Ron, D. (2004) *Mol Cell Biol* **24**, 10161-10168
22. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Murakami, S. (2006) *Apoptosis* **11**, 5-13
23. Rutkowski, D. T., Arnold, S. M., Miller, C. N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K. M., Mori, K., Sadighi Akha, A. A., Raden, D., and Kaufman, R. J. (2006) *PLoS Biol* **4**, e374
24. Rutkowski, D. T., and Kaufman, R. J. (2007) *Trends Biochem Sci* **32**, 469-476
25. Tardif, K. D., Waris, G., and Siddiqui, A. (2005) *Trends Microbiol* **13**, 159-163
26. Bechill, J., Chen, Z., Brewer, J. W., and Baker, S. C. (2008) *J Virol* **82**, 4492-4501
27. Chan, C. P., Siu, K. L., Chin, K. T., Yuen, K. Y., Zheng, B., and Jin, D. Y. (2006) *J Virol* **80**, 9279-9287
28. Li, B., Gao, B., Ye, L., Han, X., Wang, W., Kong, L., Fang, X., Zeng, Y., Zheng, H., Li, S., and Wu, Z. (2007) *Virus Res* **124**, 44-49
29. Tardif, K. D., Mori, K., and Siddiqui, A. (2002) *J Virol* **76**, 7453-7459
30. Medigeshi, G. R., Lancaster, A. M., Hirsch, A. J., Briese, T., Lipkin, W. I., Defilippis, V., Fruh, K., Mason, P. W., Nikolich-Zugich, J., and Nelson, J. A. (2007) *J Virol* **81**, 10849-10860
31. Yu, C. Y., Hsu, Y. W., Liao, C. L., and Lin, Y. L. (2006) *J Virol* **80**, 11868-11880

32. Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., and Rice, C. M. (1990) *Annu Rev Microbiol* **44**, 649-688
33. Ramos-Castaneda, J., Imbert, J. L., Barron, B. L., and Ramos, C. (1997) *J Neurovirol* **3**, 435-440
34. Upanan, S., Kuadkitkan, A., and Smith, D. R. (2008) *J Virol Methods* **151**, 325-328
35. Martinez-Barragan, J. J., and del Angel, R. M. (2001) *J Virol* **75**, 7818-7827
36. Tio, P. H., Jong, W. W., and Cardoso, M. J. (2005) *Viol J* **2**, 25
37. Tassaneetrithep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D. L., Steinman, R. M., Schlesinger, S., and Marovich, M. A. (2003) *J Exp Med* **197**, 823-829
38. Salas-Benito, J. S., and del Angel, R. M. (1997) *J Virol* **71**, 7246-7252
39. Salas-Benito, J., Reyes-Del Valle, J., Salas-Benito, M., Ceballos-Olvera, I., Mosso, C., and del Angel, R. M. (2007) *Am J Trop Med Hyg* **77**, 283-290
40. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., and Rossmann, M. G. (2005) *Nat Rev Microbiol* **3**, 13-22
41. Mosso, C., Galvan-Mendoza, I. J., Ludert, J. E., and del Angel, R. M. (2008) *Virology* **378**, 193-199
42. Acosta, E. G., Castilla, V., and Damonte, E. B. (2008) *J Gen Virol* **89**, 474-484
43. Lindenbach, B. D., and Rice, C. M. (2003) *Adv Virus Res* **59**, 23-61
44. Stohlman, S. A., Wisseman, C. L., Jr., Eylar, O. R., and Silverman, D. J. (1975) *J Virol* **16**, 1017-1026
45. Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., Jones, M. K., and Westaway, E. G. (1998) *Virology* **245**, 203-215
46. Barth, O. M. (1999) *J Submicrosc Cytol Pathol* **31**, 407-412
47. van Anken, E., and Braakman, I. (2005) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 269-283
48. Munoz-Jordan, J. L., Sanchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle, M., and Garcia-Sastre, A. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14333-14338
49. Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., and Esteban, M. (2006) *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 1032-1060
50. Cullinan, S. B., and Diehl, J. A. (2006) *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 317-332
51. Takhampunya, R., Padmanabhan, R., and Ubol, S. (2006) *J Gen Virol* **87**, 3003-3011
52. Neves-Souza, P. C., Azeredo, E. L., Zagne, S. M., Valls-de-Souza, R., Reis, S. R., Cerqueira, D. I., Nogueira, R. M., and Kubelka, C. F. (2005) *BMC Infect Dis* **5**, 64
53. Ramos-Castaneda, J., Gonzalez, C., Jimenez, M. A., Duran, J., Hernandez-Martinez, S., Rodriguez, M. H., and Lanz-Mendoza, H. (2008) *Intervirology* **51**, 335-341
54. Franz, A. W., Sanchez-Vargas, I., Adelman, Z. N., Blair, C. D., Beaty, B. J., James, A. A., and Olson, K. E. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4198-4203

Semblanza del Dr. José Ramos Castañeda



QFB con orientación en Microbiología y Bioquímica por la Facultad de Química de la UNAM. M. en C, y D. en C. especializado en Biología Celular por la UNAM; además de entrenamiento posdoctoral en el Albert Einstein College of Medicine (NY, USA) y la Escuela de Medicina de la Universidad de Michigan-Ann Arbor. Investigador en Ciencias Médicas “E” en el INSP y Miembro del Centro de Enfermedades Tropicales, Universidad de Texas-Rama Médica. SNI nivel II. Mi interés se ha concentrado en el estudio de los determinantes moleculares de la virulencia del virus dengue; utilizando para ello enfoques de bioquímica, biología celular y molecular. Así mismo, estoy interesado en los determinantes de la transmisión del dengue.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 253-188, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

MODIFICACIONES EN LA CROMATINA Y LA HERENCIA EPIGENÉTICA

CHANGES IN CHROMATIN AND EPIGENETIC HEREDITARY

Escamilla del Arenal M

Dept of Anatomy UCSF Mission Bay 1550 4th St Rock Hall #348D
San Francisco, CA 94158

Resumen

En términos generales la activación de la expresión génica está regulada por el reconocimiento y la unión de los factores de transcripción (FT) a sus secuencias blanco localizadas en los promotores y potenciadores (del inglés “enhancer”, secuencias que participan en la activación transcripcional de forma tiempo y tejido específico). La unión de los FT, a su vez, reclutará una serie de co-activadores, promoverá la unión del complejo de inicio de la transcripción y el ensamblaje de la RNA polimerasa II. Pero al interior de la célula el DNA se encuentra estructurado en cromatina. Por lo tanto, la capacidad de los FT para unirse a sus elementos de reconocimiento se ve restringida y modulada por cambios en la estructura de la cromatina, incluyendo la metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de las histonas, complejos de remodelación de

la cromatina dependiente de ATP, Polycomb y Trithorax y variantes de histonas. Algunas de estas modificaciones están involucradas en procesos epigenéticos que la célula utiliza para conservar su identidad.

Palabras clave: Cromatina, epigenética y regulación transcripcional.

Abstract

In general terms, transcriptional activation is regulated by the binding of transcription factors to their recognition sequences found in promoter and distal enhancer elements, which initiates the recruitment of co-activators and facilitates the binding of the general transcription machinery and the assembly of the RNA polymerase-II-containing pre-initiation complex (PIC) at the core promoter. The ability of transcription factors to bind their recognition elements is further modulated by changes in chromatin structure, including DNA methylation, histone modifications, histone variants, or ATP-dependent chromatin remodeling, subjects that we will broadly define in this review.

Keywords: chromatin, epigenetics and y transcripcional regulation.

Introducción

La cromatina es el sustrato donde se llevan a cabo los procesos que regulan la expresión génica (Figura 1). La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma (Figura 2). Este, está compuesto por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 formando un octámero al cual se enrollan 147 pares de bases (pb) de DNA. Las histonas se encuentran conservadas evolutivamente entre eucariotas y algunos procariotas. Los extremos amino (N-) terminales destacan de la estructura del nucleosoma y son el blanco de diferentes modificaciones post-traduccionales (MPT). En términos generales y simples, la cromatina se puede subdividir en dos grandes regiones: 1) la heterocromatina, la cual se encuentra altamente condensada, se replica de manera tardía y contiene pocos genes generalmente inactivos; y 2) la eucromatina, la cual está menos condensada y contiene a la mayor parte de los genes activos. La cromatina es la responsable de generar la estabilidad necesaria para que una célula pueda conservar su identidad celular bajo condiciones fisiológicas, asegurando el silenciamiento estable de genes linaje-inadecuado, restringiendo la asociación de FT a este grupo de genes [1,2]. La cromatina por lo tanto, desempeña un papel

fundamental en el establecimiento y mantenimiento de los patrones de expresión celular tejido-específicos.

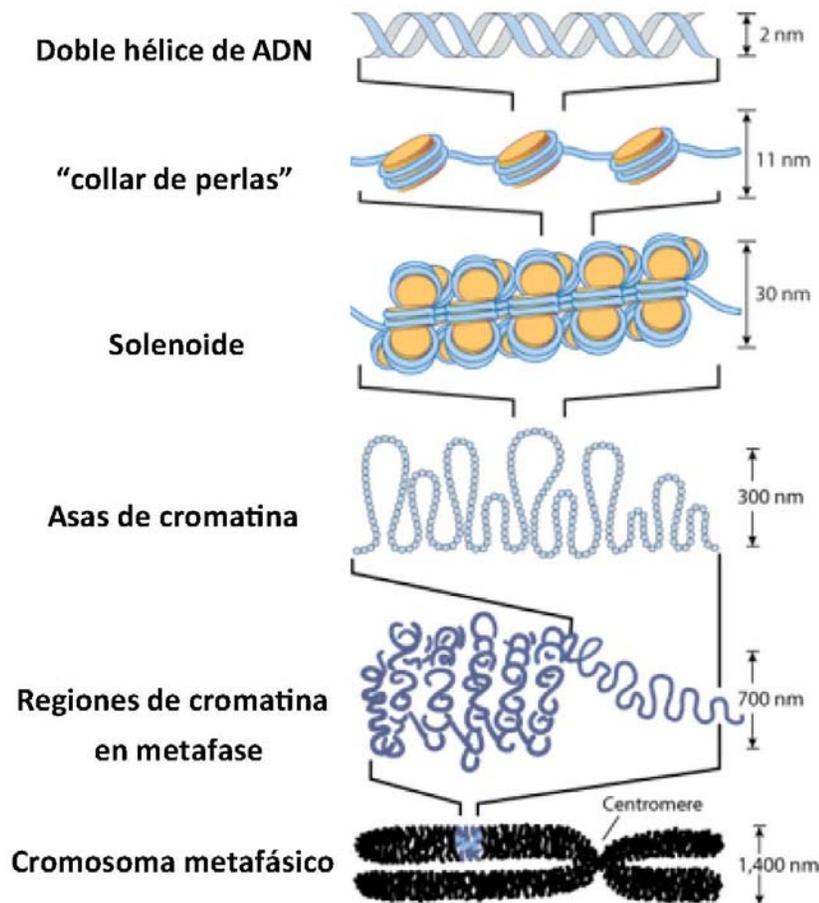


Figura 1. DNA + cromatina. Estructuración del genoma en cromatina (Modificada de [211])

La organización del DNA en cromatina tiene 2 funciones principales: 1) ayuda a compactar aproximadamente 2 m de DNA al interior de un núcleo celular de tan sólo 10 μm de diámetro (Figura 1) [3], y 2) aporta un segundo nivel a la regulación génica (Figura 2). Las principales modificaciones en la cromatina son: la metilación del DNA, la metilación de histonas, acetilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación y fosforilación [4]. Se han reportado al menos 22 clases de modificaciones de las histonas (Tabla 1; 5-6), las cuales son incorporadas o eliminadas dinámicamente de diferentes regiones del genoma por diferentes enzimas y de una manera altamente regulada. Estas modificaciones pueden alterar la estructura de la cromatina, influyendo en las interacciones no covalente

dentro y entre los nucleosomas. Las histonas son el blanco de una gran variedad de MPT, que se producen principalmente, pero no exclusivamente, en los extremos N- terminales de estas. Su incorporación puede generar patrones de modificaciones (como ejemplo, histonas con lisinas metiladas o acetiladas), los cuales son reconocidos por proteínas especializadas (llamadas “lectores”), que contienen dominios especializados de reconocimiento y pueden interactuar diferencialmente con cada una de estas modificaciones o los patrones que ellas formen. El reclutamiento de proteínas “lectoras” de la cromatina, ayuda a la incorporación de actividades enzimáticas que tendrán un efecto en la regulación de la expresión génica.

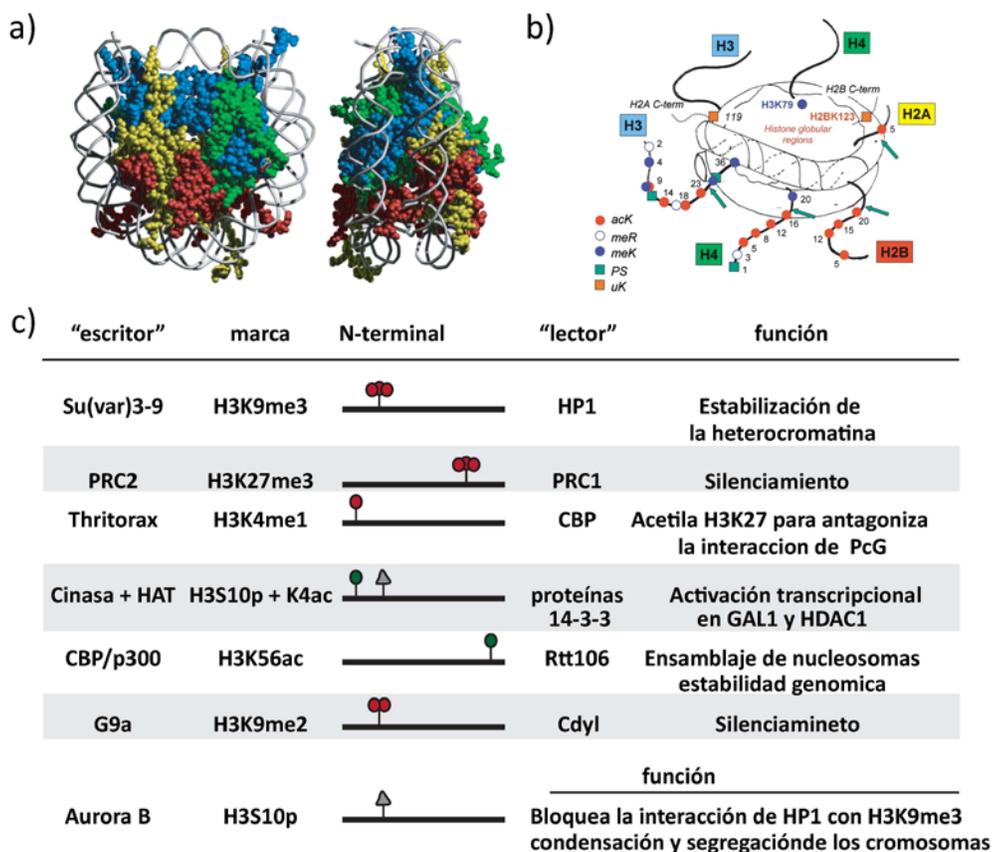


Figura 2. El nucleosoma y el código de histonas. a) Estructura cristalográfica del Nucleosoma, b) nucleosoma, con extremos N- y C- terminales, b) ejemplo código de histonas. (Modificada de [211-213]) Su(var)3-9, PRC2 [49, 103, 104, 71, 65, 168 y 214].

Escamilla del Arenal M

Tabla 1. Modificaciones observadas en la cromatina.

Modificación en el DNA	Nomenclatura	Motivo de lectura	Función
Acetilación	K-ac	Bromodominio en tandem, dedos de PHD	Transcripción, reparación, replicación y condensación
Metilación de lisinas	K-me1, K-me2, K-me3	Cromodominio, dominioTudor, dominio MBT, dedos de PHD y Hélices WD40/□	Transcripción y reparación condensación
Metilación de argininas	R-me1, R-me2, R-me3	DominioTudor	Transcripción
Fosforilación de serina y treonina	S-ph, T-ph	14,3-3, BRCT	Transcripción, reparación y condensación
Fosforilación de tirosina	Y-ph	SH2a	Transcripción y reparación
Ubiquitinación	K-ub	UIM, UIM	Transcripción y reparación
SUMOrilación	K-su	SIMa	Transcripción y reparación
ADP-ribosilación	E-ar	Dominio Macro y dominio PBZ	Transcripción y reparación
Deimination	R→Cit	desconocido	Transcripción y condensación
Isomerización de prolina	P-cis⇌P-trans	desconocido	Transcripción
Crotonilacion	K-cr	desconocido	Transcripción
Propionilacion	K-pr	desconocido	desconocido
Butirilacion	K-bu	desconocido	desconocido
Formilacion	K-fo	desconocido	desconocido
Hidroxilación	Y-oh	desconocido	desconocido
O-GlcNAcilacion (serina y treonina)	S-GlcNAc; T-GlcNAc	desconocido	Transcripción

Modificación: me1, mono metilación; me2, dimetilación; me3, trimetilación; Cit, citrulina; PHD, homeodominio de plantas; MBT, dominio de cáncer de cerebro; UIM, motivo de

interacción a la ubiquitina; SIM, motivo de interacción a sumo, PBZ, dedo de zinc de unión a poli ADP-ribosa (Tabla tomada y modificada de [14]).

Allis CD y Jenuwein T (2001) postularon que los patrones de MPT forman "códigos epigenético". Estos podrán ser leídos por proteínas "lectoras" que actuaran en conjunto con la metilación del DNA, los RNAs no codificantes y factores transcripcionales, para incidir en la regulación transcripcional. Este efecto, podrá ser mantenido durante la síntesis de DNA y la división celular [7-10]. El término "epigenética" fue acuñado originalmente por Conrad Waddington [11] para describir cambios heredables que no fueran consecuencia de cambios en la secuencia nucleotídica del DNA y que se pudieran determinar mediante un cambio en el fenotipo celular. Después de décadas de investigación y debate sobre el tema, no se ha logrado generar una definición consenso. La definición del termino epigenética continúan controvertida y ambigua [12]. Recientemente la palabra epigenética es utilizada principalmente para describir eventos que ocurren a nivel de la cromatina y que tienen un efecto en la regulación transcripcional, pero su definición como cambios heredables que ayuden a la célula a conservar su identidad a través del ciclo celular, se ha olvidado. Esta definición será discutida a lo largo de esta revisión.

Funcionalmente sabemos que los organismos multicelulares tienen un genotipo único, es decir que el material genético en cada una de las célula es el mismo. El desarrollo de un organismo genera diversidad celular, con perfiles de expresión génica desiguales y estables. Esto, también generara diversidad funcional y especificidad. Por lo tanto, la diferenciación celular es el mejor ejemplo de un fenómeno epigenético, gobernado en gran medida por lo que Waddington (1957) describió como cambios en el "paisaje epigenético" y no como alteraciones en la herencia genética. La información que guardan los procesos epigenéticos juega un papel clave en la regulación transcripcional. Entre los factores que pueden impactar a la memoria epigenéticas están los genéticos y ambientales, que generan variación fenotípica que van desde la "variación normal" hasta las patologías [13,14 y 51].

Regulación de la cromatina

Las características que definen una estirpe celular, se determina por las proteínas que la constituyen como resultado de patrones de expresión génica altamente regulados. Para dirigir la transcripción, los FT necesitan reconocer sus secuencias e interaccionan con el DNA. La cromatina genera una barrera física

para estos. Con el fin de facilitar o bloquear el acceso a estas proteínas, la célula ha desarrollado procesos, que incluyen: la metilación del DNA, el posicionamiento regulado de nucleosomas, complejos de remodelación dependiente de ATP, MPT de las histonas, variantes de histonas y RNAs no codificantes.

Metilación del DNA

La metilación del DNA es quizás la modificación en la cromatina mejor caracterizada. En mamíferos se produce con la incorporación de un grupo metilo (CH₃) a residuos de citosina en el dinucleótidos CpG [15-16]. Cuando la metilación del DNA se localiza en la región codificante de los genes se ha correlacionado con la transcripción [17]. Sin embargo, cuando la incorporación de esta marca en secuencias reguladoras, en la mayoría de los casos se correlaciona con represión. La incorporación de un grupo metilo al DNA, puede generar interferencia estérica a las proteínas que reconocen su secuencia en el DNA, pero también puede formar motivos de reconocimiento que reclutan a proteínas de unión a DNA metilado (MBD por sus siglas en inglés “Methyl Binding Domain”; [18]). Estas a su vez pueden obstruir la interacción de los FT y reclutar complejos remodeladores de la cromatina, que ayudaran a generar un ambiente represivo de la cromatina [19].

El dinucleótido CpG está sub-representados en el genoma y se encuentra metilado en un 70 al 80% [20,21 y 9]. La distribución de la secuencia CpG en el genoma no es al azar. Estos se concentran en regiones genómicas llamadas islas CpG [21] y ocupando entre 50% al 70% de los promotores [22-23]. Como ejemplo, su localización en promotores de genes de mantenimiento (del inglés “housekeeping genes”) o genes supresores de tumores, ayuda a mantenerlos activos [21]. Pero cuando están metiladas, se correlaciona con represión transcripcional [24], actuando como un mecanismo de silenciamiento relativamente estable [19].

La metilación del DNA en células de mamífero está regulada por una familia de metiltransferasas del DNA (DNMTs, del inglés “DNA methyltransferases”) que catalizan la transferencia de grupos metilo de S-adenosil-L-metionina, a la posición 5 de la citosina cuando se localiza en la secuencia di-nucleotídica CpG. Entre las DNMTs tenemos a las enzimas DNMT3a y DNMT3b las cuales son reclutadas para metilar sitios que anteriormente no se encontraban metilados (metilación de novó) y a la metiltransferasas de mantenimiento DNMT1, esta última tiene una alta afinidad por DNA hemimetilado y se encargara de copiar los patrones de

metilación de la célula madre a la hija [25-27]. De manera importante, gracias a esta capacidad se ha aceptado un modelo “semi-conservativo” para la transmisión del DNA (Figura 3; [28]).

La metilación del DNA fue considerada una modificación estable e irreversible, sólo borrada por la dilución pasiva (al no ser copiada en la nueva hebra de DNA sintetizada). En 2009, dos reportes describen la presencia de 5-hidroximetilcitosina (5hmC; [29-30]), esto sugirió la existencia de procesos de desmetilación activa (mediado por enzimas). Se ha demostrado la existencia de la familia de proteínas TET (del inglés “Ten Eleven Translocation”), las cuales poseen actividad de hidrolasas y son las responsable de convertir la 5-metilcitosina (5mC) a 5hmC [29-30]. También, se ha demostrado la presencia de otros derivados de la 5hmC, incluyendo 5-formylcytosine (5fC) y 5-carboxylcytosine (5caC) [31]. Aunque el significado biológico de los derivados de la oxidación 5mC aún está por establecerse, varias líneas de evidencia resaltan su importancia en la regulación transcripcional: 1) son candidatos a ser un intermediario esencial en el proceso de desmetilación del DNA tanto en el proceso activo como pasivo, 2) podrían estar previniendo o mejorando la unión de varias proteínas del tipo MBD y generar efectos locales o globales mediante la alteración al reclutamiento de reguladores de la cromatina y 3) el mapeo de la 5hmC en el genoma mostró una distribución distintiva, presente en genes activos y genes inactivos, incluyendo su presencia en regiones codificantes o en promotores bivalentes (estos posean marcas de activación y represión y se propone que podrían ayudar a dar respuestas inmediatas en ambas direcciones; [31]). A la fecha se ha mostrado la presencia de tres miembros de familia TET (TET1, TET2 y TET3). Se propone que cada uno tendría una función distinta y actuaría en diferentes contextos celulares (revisado en [32]). La metilación del DNA es la única modificación considerada verdaderamente epigenética. Lo anterior se basa en los estudios que demuestran su estabilidad y en el que existan mecanismo aceptados para explicar su transferencia de células madre a células hijas (esta discusión se amplía en el capítulo epigenética).

Posicionamiento nucleosomal

En comparación con el DNA “desnudo”, el DNA estructurado en cromatina es menos accesible a la unión de factores de transcripción, sugiriendo que un posicionamiento nucleosomal preciso y/o la densidad de estos, puede servir como un mecanismo poderoso para controlar la transcripción y otros procesos que se

regulan a nivel del DNA [33]. En un principio se consideró que el posiciones de nucleosomas en el DNA se realizaba de manera inespecífica, pero estudios genéticos, bioquímicos y de análisis bioinformático han demostrado que el posicionamiento de los nucleosomas está determinado por diferentes factores, entre ellos por la secuencia de DNA, por complejos remodeladores de cromatina, por los FT, por componentes del complejo de pre-iniciación y hasta por la acción de transcribir, dirigida por la RNAPol II [34-40].

Los nucleosomas están organizados en arreglos regularmente espaciados, formando matrices con posicionamientos no aleatorios y con patrones de espaciamiento entre ellos que varían significativamente entre los diferentes tipos celulares y a través de la diferenciación [41]. Estudios de mapeo nucleosomal utilizando varios organismos modelo, así como líneas células humanas, han demostrado que la ocupación nucleosomal es relativamente baja en potenciadores, promotores y sitios de terminación de la transcripción [42-45]. El tener regiones libres o con baja densidad nucleosomal, facilitaría la comunicación entre los FT y sus secuencias blanco localizadas en el DNA. Estas regiones libres, al menos en el caso de promotores y potenciadores, se encuentran flanqueadas por nucleosomas altamente posicionados, y que al mismo tiempo genera un gradiente de posicionamiento que disminuye con la distancia a la que se encuentran [46].

En el proceso de síntesis de DNA se desconoce si el posicionamiento nucleosomal se transmite o reestablece. Técnicamente resulta difícil probar si una misma histona ocupa la misma secuencia antes y después de la replicación. En líneas celulares eritroides y cultivos primarios, hemos observado como el posicionamiento nucleosomal sobre un elemento potenciador se conserva a través de la diferenciación celular eritroide y el desarrollo [47]. Este patrón fue observado exclusivamente en líneas eritroides y no en líneas celulares no eritroides, sugiriendo la importancia de tener un posicionamiento nucleosomal específico para lograr la actividad de un elemento regulador. La mutación puntual del sitio de interacción al activador transcripcional GATA-1 en la región del potenciador, mostró un efecto dramático en la capacidad de *trans*-activar a un gen reportero y el posicionamiento nucleosomal se vio dramáticamente afectado. Si este patrón nucleosomal es causa o consecuencia de la actividad del potenciador, no fue abordado, pero el hecho de que la estructura nucleosomal dependa de la interacción de un solo factor de transcripción, nos sugiere al menos que en este caso, la memoria depende más del FT que del posicionamiento nucleosomal. Esta idea se ve apoyada por un estudio donde se encontró que con la sobre expresión del FT GATA-1, en líneas no eritroides, se generaba la apertura de la cromatina y

la activación de la transcripción de los genes globina [48]. El extender este análisis a otros sistemas nos ayudara a entender el papel que el posicionamiento nucleosomal juega en memoria epigenética.

Las modificaciones post traduccionales de las histonas y sus lectores

Las histonas, y en particular su extremo N-terminal, son el blanco de diversas Modificaciones Post- Traduccionales (MPT) incluyendo: acetilación, metilación, fosforilación, ubiquinación, ADP-ribosilación y SUMOilación. Estas marcas participan en la regulación génica ya sea alterando las interacciones entre el DNA y el nucleosoma o generando una plataforma de reconocimiento, necesaria para reclutar a proteína "lectoras" con diferentes actividades enzimáticas (Tabla 2 y Figura 2). Por ejemplo, la enzima catalítica Su(var)3-9 sirve como un "escritor" de la metilación de la histona 3 metilada en la lisina 9 (H3K9), mientras que la proteína HP1 sirve como "lector" o "efector" de esta marca, reconociendo la metilación H3K9 y dirigiendo procesos biológicos, como la estabilización de la heterocromatina en áreas particulares del genoma [49].

Tabla 2. Modificaciones observadas en el DNA.

Modificación en el DNA	Nomenclatura	Motivo de lectura	Función
5-metilcitosina	5mC	MBD	Transcripción
5-hidroximetilcitosina	5hmC	desconocido	Transcripción
5-formilcitosina	5fC	desconocido	desconocida
5-carboxilcitosina	5caC	desconocido	desconocida

(Tabla tomada y modificada de [14])

Acetilación de histonas. La N-acetilación de los residuos de lisina de las histonas es una modificación que esta principalmente implicada en la transcripción, regulación de la estructura de la cromatina, y reparación del DNA.

La acetilación actúa en *cis* neutralizando la carga positiva de las proteínas histonas, disminuyendo la afinidad electrostática que hay entre los extremos N- y C-terminales de estas y el DNA negativamente cargado [50]. Por esta razón, la acetilación de histonas está a menudo asociada con una conformación de cromatina "abierta". Consecuente con lo anterior, un análisis por Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP por sus siglas en inglés) y secuenciación (ChIP-seq) confirmó la distribución de la acetilación de histonas en promotores, potenciadores y regiones transcripcionalmente activas [51-52]. La acetilación de histonas está regulada por enzimas que incluyen acetiltransferasas (HAT, del inglés "histone acetyltransferases") y desacetilasas de histonas (HDAC, del inglés "histone deacetyltransferases"), que introducen o remueven grupos acetilo, respectivamente.

Lectores de la acetilación de histonas. Los "lectores" principales de la acetilación de residuos de lisina contienen un dominio evolutivamente conservado nombrado bromodominio. Existen al menos 56 diferentes bromodominios reportados en 42 proteínas en humano [53]. Estos incluyen proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina, acetiltransferasas de histonas (HAT del inglés "histone acetyltransferase") y metiltransferasas de histonas (HMT del inglés "Histone methyltransferases") así como co-activadores transcripcionales.

Metilación de histonas. La metilación de los residuos de lisina, arginina e histidina, algunos de los cuales se traslapan con sitios de la acetilación de histonas, pueden ser asociadas con la activación o represión génica, dependiendo de los residuos modificados [5]. Por ejemplo, la metilación de lisina H3K4, H3K36 o H3K79, a menudo están asociadas con genes activos en eucromatina, y la metilación de lisina H3K9, H3K27, H3K56 o H4K20 se asocia con la represión en regiones de heterocromatina del genoma [54-55]. La metilación, a diferencia de la acetilación y la fosforilación, no altera la carga global de la molécula y presenta una mayor diversidad al ocurrir como mono-, di- o tri- metilación.

En contraste con otras modificaciones post-traduccionales, la metilación de histonas fue considerada como el candidato para conservar la herencia epigenética, debido a su bajo intercambio nucleosomal [56, 57]. Sin embargo, desde el descubrimiento de la primer demetilasa de histonas (HDM del inglés "Histone demethylases") LSD1 [58] otras 20 han sido reportadas [59], mostrando la reversibilidad de esta marca. Estas se pueden dividir en 2 familias, la primera LSD1 (KDM1A) pertenece a la clase de HDM que están limitadas a desmetilar mono- y di-metil lisinas. La segunda y más amplia clase de enzimas, se conoce

como HDM Jumonji [60]. La familia Jumonji, a diferencia de LSD1, pueden demetilar los tres estados de lisina metilada. Estas enzimas suelen encontrarse como parte integral de complejos multi-proteicos, a los cuales se le confieren gran parte de la especificidad [61].

Para entender su dinámica a través del ciclo celular, se utilizaron isotopos radioactivos y espectrometría cuantitativa de masas. Con este tipo de técnicas se estudió el restablecimiento de la metilación de H4K20 sobre las histonas recién depositadas [62]. Los resultados mostraron como H4 es primero sintetizada y progresivamente metilada en la K20 a través del ciclo celular. Se observó que la mono-metilación de las lisinas, era un paso obligado para la di-metilación y posterior tri-metilación. Esto sugirió que la metilación en H4K20 no es una marca epigenética, sin embargo el análisis del recambio de histonas marcadas (con H4K20me₂) muestran que esta tiene un recambio muy bajo, sugiriendo que no toda la H4K20me₂ fue restablecida en histonas recién depositadas en una forma dependiente de replicación. Lo anterior abre la posibilidad para que nuevos grupos de investigación confirmen la posible participación de H3K20me₂ (y posiblemente otras marcas) como marcadores epigenéticos. Adicionalmente, los autores proponen un "modelo de amortiguador" para explicar su participación como transmisores de la memoria. En este modelo se propone que la mezcla de histonas nuevas y viejas, generaran una resistencia a cualquier intento de volver a activar la transcripción. Después, la célula podrá restablecer los niveles de metilación de histonas vía el intercambio de estas y con la ayuda de HMT, que copiaran los patrones de metilación de las histonas viejas (parentales) a la recién agregadas (hijas).

Los lectores de la metilación de histonas. La gran diversidad encontrada en lisinas metiladas ha generado una gran variedad de lectores de esta marca. Con forme el número y variedad de lisinas metiladas aumenta, también crece el número de las proteínas que las pueden reconocer. Al menos 7 diferentes dominios de reconocimiento para esta marca han sido reportados (para revisión ver [63]).

Fosforilación de histonas. Al igual que la acetilación de lisinas, la fosforilación de serinas y treoninas altera las propiedades electrostáticas de las histonas al añadir un abultado y negativamente cargado grupo fosfato, al residuo modificado. La fosforilación influyen en la estructura y función general del ambiente cromatínico (para revisión véase [64]). La fosforilación de las histonas es esencial en los procesos celulares como la mitosis, apoptosis, reparación de DNA, replicación y transcripción. En términos generales, los sitios de fosforilación de

histona pueden dividirse en dos grandes categorías: 1) los involucrados en la regulación de la transcripción, y 2) aquellos involucrados en la condensación y regulación de la estructura del nucleosoma. Esto es, su función será la de bloquear la interacción de proteínas y complejos a la cromatina, interfiriendo con los códigos de reconocimiento y así facilitando la condensación nucleosomal [65-66]. Contrariamente, en respuesta a daño en el DNA, varias cinasas están involucradas en la vía de reparación del DNA y fosforilan a la S129, generando la relajación en la interacción DNA-histona lo que facilitará el acceso al DNA y su reparación [67-69].

En apoyo a la idea de generación de códigos en las histonas, la familia de proteínas 14-3-3 reconoce la histona H3 fosforilada en la serina 10 (H3S10ph, pH: fosforilada, del inglés “phosphorilated”) y H3S28ph [70], este reconocimiento se ve reforzado por la acetilación de la K14 (lisina 14) cuando ocurre en el mismo extremo N-terminal de la histona [71-72]. El reclutamiento de 14-3-3 es necesario para la activación de la transcripción de GAL1 y HDAC1, entre otros genes [71-72]. Cabe mencionar que la fosforilación de las histonas es una modificación postraducciona altamente dinámica, que se controla recíprocamente mediante la competencia entre cinasas y fosfatasa [73]. En la última década se ha adoptado de manera errónea la costumbre de pensar que las MPT de las histonas son sinónimo de epigenética. En realidad no estamos seguros, al no existir pruebas que soporten esta idea. Pero existen los elementos para explicar cómo estas podría ser parte de los mecanismos encargados de mantener la memoria epigenética.

Las variantes de histonas

En adición a la remodelación nucleosomal y las MPT de las histonas, en células eucariotas se genera variación en la estructura de la cromatina mediante la introducción de variantes de las histonas canónicas. Estas pueden funcionar, al menos en parte, alterando la estabilidad de los nucleosomas [74-77] o ampliando el repertorio para marcar diferencialmente la cromatina en regiones que tengan diferentes actividades o funciones.

Con la excepción de H4, todas las histonas canónicas tienen su variante (revisado en [78]). En mamíferos, tres variantes principales de la histona H3 se han reportado (H3.1, H3.2 y H3.3; [79-80]). Interesantemente, son casi idénticas en su secuencia de aminoácidos (es decir, H3.1 y H3.2 difieren tan sólo por un único aminoácido), aunque muestran diferentes modificaciones post-transduccionales y

se localizan en dominios o territorios cromosómicos diferentes [45 y 81,82]. Estas no son las únicas variantes que la H3 muestra, a través de la evolución se puede observar la función relevante que juegan, como la variante de H3 específica de centrómeros que se ha caracterizado en la gran mayoría de los eucariotas (nombrada en *Saccharomyces cerevisiae*, Cse4; en *Drosophila*, CID; y en *Homo Sapiens*, CENP-A). Esta variante es esencial para la supervivencia celular [83].

La histona H2A también tienen sus variantes, estas incluyen a la histona H2A.Z que desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario temprano, ratones que carecen de esta mueren poco después de la implantación [84]. Mediante técnicas de análisis masivo, incluyendo ChIP en *Saccharomyces cerevisiae* se encontró que H2A.Z (Htz1) se localiza principalmente en promotores [85]. Sorprendentemente, el papel de H2A.Z en el desarrollo temprano puede ser en el establecimiento de la heterocromatina [86]. Como ejemplo la vemos enriquecida en regiones pericentroméricas en la heterocromatina constitutiva [87].

En 2006, Hake y Allis postularon la hipótesis del "código de barras para H3" que postula la utilización de variantes de la histona H3 para influir en los estados epigenéticos durante la diferenciación celular y el desarrollo [79]. Las variantes de histonas estarían ayudado a indexar el genoma en dominios funcionalmente independientes (es decir, eucromatina, heterocromatina facultativa y heterocromatina constitutiva) que, a su vez, establecen y mantienen la memoria epigenética en cada tipo celular. De ser esto correcto, se argumentó como requisito la necesaria existencia de chaperonas específicas o los mecanismos para localización diferencial de las variantes en el genoma (Tabla 3). Nakatani y colaboradores [88] ya habían reportado a las chaperonas de las histonas para H3.1 y H3.3 en mamíferos (CAF-1 y HIRA, respectivamente). Un reporte reciente mostro la existencia de 2 chaperonas para H3.3 con la capacidad de reclutarla, con la ayuda de complejos de remodelación, a diferentes regiones del genoma [89]. Hasta ahora, no se ha encontrado ninguna chaperona de histonas para H3.2. Interesantemente, las variantes H3.1, H3.2 y H3.3 también difieren en los tiempos en que se transcriben y los patrones de MPT a que son sujetas: H3.1 se enriquece en MPTs asociadas con la activación transcripcional (como la acetilación de K14) o con silenciamiento (como la dimetilación de K9), H3.2 se enriquece en MPTs asociados con silenciamiento (con la di y trimetilación de K27) y finalmente la variante H3.3 se enriquece en MPTs asociadas con la activación génica (como la hiperacetilación y dimetilación de K36 y K79) [79], apoyando la idea de que estas variantes de H3 puedan tener y marcar distintas funciones biológicas.

Escamilla del Arenal M

Tabla 3. Variantes de histonas, función y chaperonas reportadas.

Variante	Chaperona	localización	Fenotipo por la ausencia	por la ausencia de la chaperona
H3.3	HIRA	Eucromatina, región codificante y promotores	ND	Letalidad embrionaria (6.5-10.5 dpc)
H3.3	Daxx-ATRX	Telómeros, repetidas pericentroméricas	ND	Letalidad embrionaria (9.5 dpc)
H3T	sNASO	testículos	ND	ND
CENP-A	HJURP	centromero	Letalidad embrionaria (3.5-7.5 dpc)	ND
HZA.Z	Chz1, SWR1	Elementor de regulacion, promotores, repetidas pericentroméricas	Letalidad embrionaria (4.5-7.5 dpc)	Letalidad (<i>C. elegans</i>)
H2AX	ND	Cuerpo XY y sitios donde hay corte doble al DNA	Fertilidad reducida o ausente	ND
MacroH2A	ND	Cromosoma X inactivo y promotores	Malformaciones en cerebro (<i>zebrafish</i>)	ND
H2AL	ND	repetidas pericentroméricas	ND	ND
H2A.Bbd	ND	ND	ND	ND
TH2A	ND	testículos	ND	ND
TH2B	ND	testículos	ND	ND

N.D. no determinado; d.p.c. días después del coito (Modificado de134)

Al ser las variantes de histonas un excelente sistema para indexar el genoma. El entender como son transmitidas a través de la replicación del DNA y la mitosis es vital para comprender su verdadero potencial como guardianes de la memoria epigenética. Se propuso el "modelo de herencia semi-conservativa" donde los nucleosomas son "divididos" en dímeros de H3-H4 y se distribuyen aleatoriamente entre las hebras de DNA madre e hijas [90-91]. Sin embargo, con experimentos en cromosomas SV40 (cromosomas bacterianos, [92-93]), se propuso un "modelo conservador" [94-95]. Este sugiere la trasmisión de los

nucleosoma parentales intactos (tetrámeros), y de manera aleatoria, a ambas cadenas de DNA hijo [96-98], lo que significa que las marcas epigenéticas en las histonas parentales serían "diluidas". Este problema se solucionaría mediante la adición de nuevas variantes de H3 y el restablecimiento de sus modificaciones post transduccionales. Pero los mecanismos no están claros.

Complejos remodeladores de la cromatina.

Estos complejos regulan la accesibilidad a la cromatina e hidrolizan ATP para alterar las interacciones ADN-histona. Los Complejos Remodeladores de la Cromatina (CRC) facilitaran el acceso a los factores de transcripción mediante la ruptura transitoria del complejo DNA-histonas o formando un asa alrededor del octámero o cambiando la posición de estos en el genoma [33].

El desplazamientos de los nucleosomas ocurren en distancias cortas, se cree que se llevan a cabo sin que estos se disocien por completo del ADN [99]. El complejo SWI/SNF originalmente estudiado en levadura y *Drosophila* constituye el complejo pionero seguido por NURF, CHRAC y ACF entre otros (100). La ATPasa es la sub-unidad que se encuentra conservada entre todos los complejos que remodelan la cromatina. Pero estos no pueden reconocer y unirse al ADN, por lo que deben de ser reclutados por factores transcripcionales o co-factores [101].

Polycomb y Trithorax

La familia de proteínas Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG) fueron identificadas en *Drosophila*, donde se demostró que son esenciales para la herencia estable de un gen, ya sea en estado silenciado (por PcG) o activo (por TrxG) [102]. La familia de PcG forma complejos multiproteicos denominados PRC1 y PRC2. PRC2 (del inglés "PcG repressive complex 2") está involucrado en la incorporación la marca represiva H3K27me3 (histona 3 Lisina 27 tri-metilada) [103] a través de su proteína catalítica EZH2. Esta marca será reconocida por el complejo PRC1 (del inglés "PcG repressive complex 1") quien a su vez reclutará otras actividades que participaran en el silenciamiento génico. Por el otro lado, TrxG funcionara de manera antagónica a PcG, acetilando la H3K27 y bloqueando el reclutamiento y silenciamiento de PcG [104].

Se ha reportado en *Drosophila* que el complejo PcG y su marca asociada H3K27me3, se ven enriquecidos en elementos de respuesta a Polycomb (PREs;

[105-109]), previo a la replicación del DNA. De esa manera, se propone que la marca será heredada por dilución durante la replicación del DNA [110]. El mecanismo por dilución parece ofrecer un mecanismo epigenético sencillo y rápido de la herencia a través de la replicación del DNA, pero también supone que los altos niveles de la marca no son necesarios para establecer un estado de represión (para PcG) o activación (para TrxG). Sin embargo los PREs no han sido identificados en humano.

Adicionalmente, se ha reportado a PRC2 (miembro de la familia PcG) localizando con la horquilla de replicación y co-localizado con PCNA (un componente crucial de la maquinaria de replicación, [111]) durante la fase de síntesis, esta asociación ayudaría a mantener la represión a través del ciclo celular. PRC2 también se une a H3K27 trimetilada; su propio producto catalítico. Esto ayudaría a extender la marca a los nuevos nucleosomas vecinos, restaurando así el silenciamiento epigenético. PcG y TrxG y sus marcas, también han sido aceptados como candidatos para transmitir la información de la célula madre a las hijas.

Los RNAs no codificantes

En el siglo XX los estudios de regulación génica se centraron a zonas del genoma que codificaban para proteínas, aunque estas sólo representan entre 2-3% del genoma en seres humanos. Al resto del genoma incluso se le nombro "DNA basura". En las últimas dos décadas este 97-98% del genoma restante se ha convertido en el foco de atención para la comunidad científica. Estudios evolutivos han mostrado cómo con la manera en que crece la complejidad de un organismo, crece el porcentaje de DNA no codificante y no el DNA que codifica para proteínas.

Con el avance en la tecnología y la generación de plataformas de secuenciación masiva, se ha determinado que el genoma se transcribe casi al 100% [112, 23]. Sin embargo, se observó que algunas regiones no codificantes aunque se transcribían exhibían una menor abundancia en comparación con los RNAs que codifican para proteínas, lo que nos invita a ser cautos en las conclusiones y pensar que algunos de ellos podrían ser el producto de ruido transcripcional, es decir de la generación de un transcrito que no tenga una función biológica [113-114]. Los RNAs no codificantes (ncRNAs, del inglés "Non Coding RNA") pueden dividirse en 2 grupos principales, los pequeños y los largos (lncRNAs del inglés "Long Non Coding RNA").

Los lncRNAs. Estos transcritos se definen convencionalmente como transcritos que tienen más de 200 nucleótidos de longitud y que no tienen la capacidad de codificar para una proteína [115]. Varios estudios han demostrado que una de sus funciones es la de reclutar complejos que generan cromatina represiva y de esta forma crear un estado que permitirá silenciar la expresión génica [116-121]. Por ejemplo, en el proceso de Inactivación del Cromosoma X (XCI, por sus siglas en inglés “X-chromosome Inactivation”). La expresión del lncRNA *Xist*-RNA en el cromosoma X por inactivar, cubre el cromosoma X en *cis* e inicia el reclutamiento de complejos asociados a la represión, induciendo la formación de heterocromatina y el silencio de los genes localizados en esta cromosoma [122]. Este lncRNA de 17 kb (kilo bases) de largo, recluta de forma dependiente de Jarid2D, al complejo represivo polycomb 2 (PRC2) [123, 120]. PRC2 participa en el silenciamiento génico incorporando la tri-metilación a la Lys 27 de la histona H3 (H3K27me3; [124]). Curiosamente, la regulación del *RNA-Xist* también es controlado por otros dos lncRNAs, *Tsix* y *Jpx* [125-128, 116]. En un ejemplo diferente, la expresión del lncRNA HOTAIR en el locus HOXC en mamíferos, es necesaria para mediar el silenciamiento del complejo HOXD en *trans* de una manera dependiente de PRC2 [129].

Los lncRNAs cuando se asocian a aumentadores se conocen como RNAs potenciadores (eRNAs del inglés “enhancer RNAs”) [130-23]. Los eRNAs son no-poliadenilados y su transcripción es bidireccional a partir de la región de donde se localiza el aumentador [132]. Múltiples líneas de evidencia apoyan funciones reguladoras de los eRNAs en la activación génica. Por ejemplo, la eliminación de estos, causa la reducción en la expresión de los genes que se localizan en la cercanía [135-137].

La posición física que tienen los lncRNAs con respecto a regiones codificantes del genoma es importante. Un grupo de estos se transcriben en la hebra complementaria, de manera superpuesta a genes que codifican para proteína o lncRNAs. Por lo tanto comparten una región de su secuencia. A este grupo de lncRNAs se les define como transcripciones naturales antisentido (NATs, por sus siglas en inglés “Natural Antisense Transcripts”) [138-139]. Para un grupo de NATs, se ha demostrado como el compartir secuencia es suficiente para silenciar al gen localizado en la hebra complementaria [140], mostrando que lo importante para silenciar para este grupo es la transcripción en *cis* y no el lncRNA. La función tanto de eRNAs como de otros lncRNAs parece estar relacionada con el establecimiento de estados silenciados u activos de la transcripción y no como marcadores epigenéticos que guarden la memoria a través del ciclo celular; este es actualmente un foco importante de estudio.

RNAs pequeños no codificante. Estos transcritos se definen convencionalmente como transcritos que tienen menos de 200 nucleótidos de longitud. Dentro del grupo de sncRNAs (del inglés, “Small ncRNAs”) se encuentran lo RNAs pequeños de interferencia (siRNAs del inglés, “Short Interfering RNAs”), los micro RNAs (miRNAs) y los RNAs que interactúan con la proteína piwi (piRNAs del inglés, “piwi-interacting RNAs”). Las funciones de los RNAs pequeños dependen de Argonaute (Ago), una familia de proteínas que durante la evolución has sido altamente conservada y que une RNA [141]. La interacción de Ago con siRNA, hará que este complejo sea reclutado a las secuencias blanco del siRNA y así Ago cortará el mRNA y silenciará la expresión del gen [142].

Mientras que los piRNAs están relacionados con funciones nucleares, incluyendo la integridad genómica [143], los siRNAs y miRNAs median el silenciamiento génico a través de la degradación del mRNA o la inhibición de la traducción del mRNA en el citoplasma [143]. Los siRNAs son de doble cadena (dsRNA) y median el silenciamiento postranscripcional, reclutando complejos remodeladores de la cromatina y deacetilasas de histona que inducirán la formación de heterocromatina en levadura [144]. Los miRNAs son RNA pequeños (de 18–24 nucleótidos de longitud), generados a partir de un precursor de mRNA que será cortado por el complejo RNA polimerasa III, DROSHA y DICER para producir un miRNA maduro de cadena sencilla. Los miRNAs puede controlar la expresión génica al ser reclutados a los mRNAs y degradar o generar represión traduccional [145-146]. También pueden controlar la expresión génica mediante el reclutamiento de complejos modificadores de la cromatina a regiones reguladoras del DNA y de esta forma alterar la conformación de la cromatina silenciándola [147-148]. La tercera clase de RNAs pequeños son los piRNAs, estos tienen de 26–30 nucleótidos de longitud, se producen de pequeños locus que generalmente de extienden de 50 a 100 kb. En un ejemplo muy interesante, en células germinales, se mostró como piRNAs interactúan con transposones activos para dirigir su silenciamiento vía la degradación del transcrito de RNA, pero la degradación de este transcrito genera más piRNA [150]. Este proceso genera ciclos de auto-amplificación del piRNA que ayudan a mantener al transposón silenciado a través del ciclo celular.

Finalmente, aunque los sncRNA participan en la regulación de diversos procesos biológicos como el crecimiento celular, ciclo celular, apoptosis y diferenciación [151-153] no nos queda clara su participación para mantener la memoria a través del ciclo celular. Está claro que al tener la capacidad de reclutar modificadores de la cromatina y selectivamente silenciar la expresión de un gen o grupo de genes, estarán siendo parte del estímulo que genera un cambio en la

expresión génica. Una opción para su participación como marcadores epigenéticos, podría estar en su participación vía la formación de ciclos de auto amplificación o siendo heredados en *trans* como parte del contenido citoplasmático.

Epigenética

El desarrollo en mamífero requiere de la especificación de más de 200 tipos de células a partir de una sola célula totipotencial. Este reto es más impresionante cuando se toma en cuenta que cada una de estas células lleva consigo la misma información genética y aun así tienen la capacidad de establecer y mantener un perfil de expresión génica único, que constituye su identidad celular. A estos cambios heredables, que involucran un cambio en la expresión génica y fenotipo celular, pero que no involucran cambios en la secuencia del DNA, se les denominan epigenéticos. Las células diferenciadas dependen de una memoria epigenética para transmitir y mantener los patrones de expresión que les dan identidad celular a través de múltiples divisiones celulares [154].

Definición

Las modificaciones de las histonas son a menudo señaladas como "modificaciones epigenéticas", sin embargo, no sabemos cómo son transmitidas a través del ciclo celular [155, 50]. Tres criterios independientes son determinantes para saber si una señal molecular es en efecto epigenética: 1) deberá tener un mecanismo de propagación a través del ciclo celular, 2) se deberán tener pruebas de que su transmisión es auto-sostenible (es decir que no se necesite repetir el estímulo que generó la marca); y 3) deberá tener un efecto en la expresión génica. Hasta ahora la metilación del DNA (y los FT, ver más adelante) es la única marca que se conoce que cumple con los tres requisitos: 1) se transmite de manera semi-conservativa durante la replicación del DNA. La metilación del DNA se realiza de forma simétrica en ambas hebras de DNA, la replicación da como resultado dos hebras hijas hemi-metiladas, estas son el blanco de la metiltransferasa de mantenimiento que copiará el patrón de metilación de la hebra de DNA madre a la hija [156] (Figura 2); 2) el DNA metilado *in vitro*, una vez re-introducido a la célula permanece metilado después de varias rondas de replicación [175]; y 3) la metilación regula la transcripción.

La forma más común de transferir estados epigenéticos y probablemente la menos mencionada podría ser en *trans*, mediante la auto-regulación y redes de amplificación que los FT pueden establecer (Figura 3; [157]). Estos son a menudo el sistema de elección para la transmisión de memoria celular en organismos simples, tales como procariontas y eucariotas unicelulares. Si un FT activa su propia transcripción (o reprime las redes antagónicas) y es autosuficiente después de retirar el estímulo que lo originó, se genera un estado epigenético. Después de cada división celular, los FTs son heredados gracias a la transmisión de las proteínas contenidas en el citosol. Una vez terminada la división celular, los FT reanudarán su función en *trans* al interactuar. Algunos RNAs pequeños también pueden actuar como señales epigenéticas en *trans* [150 y 158].

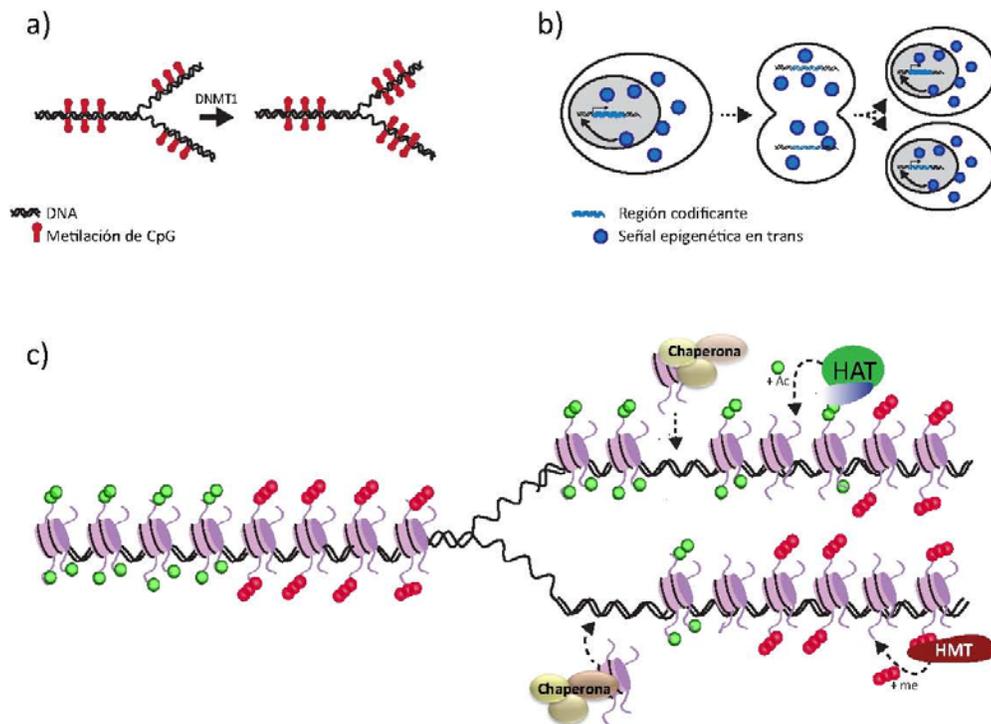


Figure 3. Transmisión mitótica de la información. a) Modelo semi-conservativo para la transmisión de la metilación del DNA. En la transmisión de la metilación, DNMT1 copia los patrones de metilación de la hebra madre a la hija. b) Modelo de transmisión en *trans* de la memoria epigenética. La célula está representada por las esferas blancas que se dividen en mitosis y el núcleo por una gris. c) Modelo de reforzamiento para la transmisión en *cis* de la información. Las chaperonas incorporan histonas nuevas y las enzimas HAT o HMT (entre otras) con la ayuda de proteínas, copiaran las modificaciones de las histonas vecinas a las recién incorporadas (Modificada de [163]).

En contraste, las señales *cis* están físicamente asociadas y se heredan junto con la cromatina, adheridas a las regiones que regulan; por ejemplo, una modificación covalente del DNA, como la metilación, se transmitirá al momento de replicar el DNA o las variantes de la histona con sus modificaciones post-traduccionales o hasta los complejos de remodelación, en principio, se transmitirán adheridos a los extremos terminales de las histonas [159,160 y 5].

Aunque aún no está claro cuál de estas marcas, proteínas o procesos pueden ser mecanismos epigenéticos reales e incluso si podrían serlo, la implementación de nuevas técnicas incluyendo análisis cuantitativo por espectrometría de masas (basado en la etiquetación con el uso de isótopos marcados), nos proporcionan una mejor resolución para los desafíos técnicos existentes. Este tipo de técnicas nos permiten detectar simultánea y diferencialmente, las modificaciones entre las histonas existentes y las recién depositadas.

Establecimiento

Los estados epigenéticos son establecidos por estímulos transitorios provenientes de señales ambientales, entre ellas, las generadas durante el desarrollo de un organismo en la diferenciación y especificación celular. Estas señales en *trans* convergen en la cromatina para amoldar el paisaje transcripcional y entonces generar firmas epigenéticas. Diferentes procesos pueden estar implicados en los estímulos iniciales, incluyendo FTs que directamente o mediante el reclutamiento de enzimas que modifiquen la cromatina [48] o RNAs pequeños [161] o largos [162]. Una vez realizado el estímulo inicial, las modificaciones epigenéticas deben asumir el control y ser mantenidas y transmitidas a través del ciclo celular.

Mantenimiento

Un aspecto importante para la epigenética es comprender si la marca, proceso o proteínas, tienen la capacidad de transmitirse de generación en generación sin la necesidad de un estímulo adicional; es decir, de conservar la memoria del estímulo inicial. Cuando una célula entra a la fase S del ciclo celular, se duplica la cantidad de DNA y de histonas. Ambas moléculas, al ser sintetizadas *de novo*, se encontrarán ausentes de modificaciones, en términos generales

podrán ser involucradas tanto en activación como en represión y podrían cambiar el destino de la célula. Por lo anterior resulta importante que la célula tenga los mecanismos para mantener su identidad. En el caso de la metilación del DNA, un modelo de transmisión semi-conservativo (Figura 3) explica cómo reproducir patrones de metilación de DNA durante su síntesis. En el caso de las marcas de las histonas, lncRNA y variantes de histona, su papel en el mantenimiento de memoria, aún carece de modelos aceptados. Una repartición semi-conservativa de los tetrámeros de histonas H3-H4 ha sido propuesta, la cual se realizaría al momento de replicar la cromatina agregando un dímero de H3-H4 con sus respectivas marcas a cada célula hija (Figura 3). Aunque lo anterior parece un modelo práctico, al menos para algunas modificaciones, la acumulación de pruebas sugiere que este mecanismo no es factible [163]. Teniendo en cuenta que la gran mayoría de los tetrámeros de histona H3-H4 se segregan de forma conservadora [164-165 y 98], se sugiere que el mecanismo más probable podría ser el utilizar a los histonas existentes como planilla para restablecer las mismas modificaciones en histonas recién depositan (Figura 2; [98]).

También se han propuesto mecanismos de “retroalimentación” (del inglés “feedback loops”), en los cuales las enzimas responsables de agregar una marca, serán reclutadas por factores que reconocen la misma marca cerrando así el círculo. Entre estos ciclos de retroalimentación tenemos a: SUV39H1 y HP1 con H3K9me o PR-SET7 y L3MBTL1 con H4K20me1 o EZH2 y EED con H3K27me3 o Cdy1 y G9a con H3K9me2 [91 y 166-168]. Entre ellas y como ejemplo, Cdy1 es reclutada a cromatina cuando su cromodominio reconoce la H3K9me2, Cdy1 a su vez parece reclutar a la HMT G9a, la cual di-metilará la histona H3K9 que a su vez reclutara a Cdy1, generando un ciclo necesario, posiblemente, como un refuerzo local que impida el borrado. Estos ciclos podrían representar lo que llamamos “las marcas epigenéticas”, las cuales no necesariamente serán marcas agregadas a la cromatina y podrán ser procesos. En este caso los estados epigenéticos están siendo reforzados por una intercomunicación entre modificaciones de las histonas y sus efectores.

Enfermedades

El cáncer tradicionalmente se ha visto como un conjunto de enfermedades generadas por la acumulación de mutaciones genéticas que dan lugar a la neoplasia [169]. Sin embargo, el cáncer no siempre está asociado a mutaciones en el DNA. La introducción del término epigenética nos ayudó a ampliar y

comprender los mecanismos de regulación afectados, en esta y otras enfermedades [149, 170-171]. Diferentes procesos que ocurren a nivel de la cromatina, han sido encontrados afectados en diferentes tipos de cáncer en humanos [172-174] se han descrito mutaciones de DNMT1 en cáncer colo rectal [176], mutaciones en DNMT3B están asociadas con inestabilidad cromosomal [177], y se han sugerido están asociadas con cáncer de mama y pulmón [190], entre muchos ejemplos. En cáncer, es común observar la hipermetilación de regiones promotoras de genes supresores de tumores lo que deriva en su silenciamiento [170]. Análisis por secuenciación masiva, ha mostrado una metilación anormal de islas CpG que va del 5% a 10% [149], aunque en realidad no sabemos si son causa o consecuencia del proceso cancerígeno.

Entre las enfermedades y afectaciones a la cromatina más mencionadas

En cáncer de mama. Se ha observado silenciamiento de genes supresores de tumores e inestabilidad genómica asociada frecuentemente a modificaciones anormales como la hipermetilación del DNA, en combinación con cambios en la cromatina [178]. Genes que controlan el ciclo celular y la reparación del DNA, como RB, BRCA1/2 y PTEN también se muestran epigenéticamente afectados [179].

Estabilidad cromosómica. Para mantener la estabilidad del genoma es necesario mantener silenciados a elementos repetitivos incluyendo LINES, SINES y transposones, los cuales al ser expresados tienen la capacidad de integrarse en otras regiones del genoma y así afectar su función. Estas regiones se muestran desmetiladas en diferentes líneas cancerígenas [180-182 y 25].

Mutaciones en HMT y HDM. La larga lista de estos incluye: LMA (leucemia mieloide aguda), LLA (leucemia linfocítica aguda), B-NHL (linfoma no Hodgkin de células B), LF (linfoma folicular), SMD (síndromes mielodisplásicos), MPD (enfermedades mieloproliferativas) y CCT (carcinoma de células transicionales de la vejiga urinaria) (para una revisión véase [14]).

En lncRNAs. Se ha observado la sobreexpresión HOTAIR en cáncer de mama avanzado y colo rectal [183,184], e interesantemente la manipulación de los niveles de expresión de este lncRNA en células malignas cambia el potencial invasor de estos cánceres, alterando los niveles de metilación de la histona H3K27 y de la expresión génica [184 y 117]. También tenemos una creciente lista de genes regulados por transcritos-anti sentido implicados en el desarrollo normal del

cerebro y/o desregulados en enfermedades como el enfermedad de Alzheimer (BACE1 y BACE1-AS) y en el síndrome del X-Frágil (FMR1 y ASFMR1, del inglés “Fragile X mental retardation”), entre otros [185].

En el cerebro. La función normal del cerebro involucra procesos epigenéticos [186-189], por lo tanto, no es sorprendente encontrar trastornos neurológicos asociados a cambios en las marcas de cromatina. Como ejemplo, sintomatologías que incluyen el síndrome de Prader-Willi (PWS) y el síndrome de Angelman (AS) entre otros [191].

Factores ambientales como la inanición materna y el uso de las tecnologías de reproducción asistida, han demostrado impactar el epigenoma del embrión, se ha propuesto que algunas de las alteraciones epigenéticas asociadas con inanición maternal en la vida fetal persisten a través de la edad adulta, posiblemente contribuyendo a trastornos tardíos como enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2 [192-194 y 155].

Perspectiva terapéutica

En los últimos años un gran número de fármacos que afectan a las modificaciones de la cromatina y a las enzimas que las regulan, son tema de estudio. Como ejemplo encontramos a inhibidores de las DNMTs o HDAC moléculas que han sido aprobadas por la FDA para el tratamiento del cáncer e importantemente, han demostrado ser eficaces contra una gran variedad de neoplasias malignas [196]. Recientemente, se han generado compuestos novedosos contra componentes epigenéticos en el tratamiento de defectos genéticos específicos. Como ejemplo tenemos al inhibidor de la metil transferasa de histonas DOT1L (EPZ004777) que inhibe la metilación de H3K79 y previene la transcripción de los genes que intervienen en leucemogenesis y mata a las células cancerosas con translocaciones de MLL [197]). Los inhibidores selectivos contra bromodominios (JQ1 o GSK525762) [198-199] que inhiben la transcripción de MYC, la cual se ha visto se sobre expresada en la mayoría de los cánceres [200].

La naturaleza dinámica de la acetilación de histonas está determinada por la actividad contrapeso de acetil transferasas y desacetilasas de histonas (HDAC). En la última década, un número de inhibidores de la HDAC han demostradas cambiar la estructura de la cromatina y provocar la expresión de los genes aberrantemente silenciados, lo que a su vez se asocia con la inhibición del crecimiento y la apoptosis de células cancerosas [201,202]. La presencia de

múltiples aberraciones genéticas y epigenéticas dentro del cáncer, sugiere que las terapias serán más adecuadas cuando se combinen estrategias como la quimioterapia estándar con los compuestos antes mencionados [203,204]. Los estudios preclínicos con inhibidores de la HDAC y en combinación con inhibidores de la DNMT han mostrado tener un mayor efecto, logrando la expresión de genes silenciados y apoptosis de líneas celulares malignas tanto en cáncer de colon como de pulmón [205-207]. Aunque está claro que una desacetilación o desmetilación global puede traer efectos secundarios.

Comentarios finales

La célula eucariota contiene su información en el DNA. Esta molécula se compacta y regula diferencialmente, en un espacio confinado llamado núcleo. Sin embargo cuando el ADN se empaqueta en cromatina, hay que permitir su lectura para eventos como, la replicación, reparación y en respuesta a las necesidades celulares y a los estímulos externos. Estos estímulos cuando cambian el fenotipo celular, podrán ser mantenidos por mecanismos epigenéticos y generar identidad y diversidad celular.

El término epigenética ha sufrido una gran pérdida en su significado al utilizarse indiscriminadamente para describir a los eventos que ocurren en la cromatina. Los mecanismos para conservar la memoria celular no necesitan ser marcas en la cromatina, si un FT activa su propia transcripción (o reprime las redes antagónicas) y su expresión es mantenida de manera autosuficiente después de retirar el estímulo, se estará generado un estado epigenético. Se ha llegado a postular que las modificaciones en la cromatina son tan solo el reflejo de estados transcripcionales y no los mecanismos para conservar la memoria del estímulo original. Pero como contra argumento, en eventos como en el desarrollo embrionario temprano, en mamíferos, es necesaria una ola de desmetilación y el bloqueo en la *transcripción* de la variante de histona H3.3 para reprogramar el genoma ([208] y revisado en [209]). Esto nos sugiere que al menos la metilación del DNA, globalmente aceptado por la comunidad científica, y las variantes de histonas, podrían representar marcas epigenéticas que servirían para indexar el genoma y sus diferentes estados transcripcionales.

Adicionalmente, mecanismos en *trans* podrían ayudar a la célula a mantener la herencia epigenética. Durante el ciclo celular la célula heredará a cada una de las células hijas la mitad de su contenido citoplasmico, que incluye proteínas, siRNAs, etc. estos cuando formen parte de ciclos de auto-amplificación

o de auto-regulación nos ayudarían a entender explicando cómo es que la memoria epigenética es heredada. Pero de ser así, como explicar el proceso de la inactivación del cromosoma X, donde ambos cromosomas tienen la misma información y están inmersos en el mismo núcleo celular pero mostraran estados transcripcionales opuestos (revisado en [170]). La respuesta no es clara, pero con la inactivación del cromosoma X una cadena de mecanismos y marcas, parecen trabajar de manera concertada y redundante, para apagar y mantener silenciado a este cromosoma.

Por último, un caso interesante en la disputa entre que es y que no es verdaderamente epigenética; encontramos a las neuronas, ya que no se dividen. Estas al ser tan longevas, deben mantener un estado transcripcional definido por un periodo de tiempo muy largo. Este fenómeno podría ser tomado estrictamente como no verdaderamente epigenético puesto que la replicación del DNA no ocurre, sin embargo se ha argumentado que en las neuronas las señales utilizadas para mantener estados epigenéticos a través de la división de celular, fueron adaptados y utilizados para estabilizar perfiles transcripcionales después de que los estímulos han desaparecido [210].

En conclusión, considero que al menos 4 procesos biológicos estarán participando en la conservación de la memoria epigenética: la metilación del DNA, las variantes de histonas, ciclos de “retroalimentación” (incluyendo a Polycomb and Trithorax) y la transferencia del contenido citosólico. Las MPT de las histonas también tienen la capacidad de participar como marcadores epigenéticos, pero los mecanismos mediante los cuales se transmiten, no han sido documentados.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Irene Patricia del Arenal Mena, Dra. Rachel Duffié y Dr. Inti Alberto De La Rosa Velázquez, por la lectura crítica del manuscrito.

Referencias

1. Filion GJ, van Bommel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, de Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ, van Steensel B (2010). *Cell*. **143**(2):212-24.
2. Gaetz J, Clift KL, Fernandes CJ, Mao FF, Lee JH, Zhang L, Baker SW, Looney TJ, Foshay KM, Yu WH, Xiang AP, Lahn BT (2012). *Cell Res*. **22**(5):848-58.
3. Li G, Sudlow G., Belmont AS (1998). *J Cell Biol*. **140**(5):975-89

4. Maze I, Noh KM & Allis CD (2012). *Neuropsychopharmacology*. **38**(1):3-22.
5. Kouzarides T (2007). *Cell* **128**, 693–705.
6. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, et al. (2011). *Cell* **146**, 1016–1028.
7. Strahl BD., Allis CD (2000). *Nature* **403**: 41–45.
8. Turner BM (2000). *Bioessays* **22**: 836–845.
9. Jaenisch R, Bird A (2003). *Nat Genet* **33**: 245–254.
10. Spitale RC, Tsai MC, Chang HY (2011). *Epigenetics* **6**: 539–543.
11. Waddington CH (1942). *Endeavour* 1: 18–20
12. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A (2009). *Genes Dev.* **23**, 781–783.
13. Huang C, Li Z, Wang M, Martorell R (2010). *J Nutr.* **140**:1874–8.
14. Dawson MA, Kouzarides T (2012). *Cell.* **150**(1):12-27. Review.
15. Yu X, Callaway CW, Lane RH, McKnight RA (2009). *FASEB J.* **23**:2438-49.
16. Maccani MA, Marsit CJ (2009). *Am J Reprod Immunol.* **62**:78-89.
17. Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S (2007). *Nat. Genet.* **39**, 61-69.
18. Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A (1992). *Cell.* **69**(6):905-14.
19. Jones PA, Liang G (2009) *Nat Rev Genet.* **10**(11):805-11.
20. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982). *Nucleic Acids Res* **10**:2709-2721.
21. Bird A (2002). *Genes Dev* 16:6–21
22. You JS, Jones PA (2012). *Cancer Cell.* **22**(1):9-20. Review.
23. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, et al. *Nature.* **489**(7414):101-8.
24. Goll MG, Bestor TH (2005). *Annu Rev Biochem.* **74**:481-514. Review.
25. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ (1999). *J Biol Chem*; **274**:33002–10.
26. Maunakea AK, Chepelev I, Zhao K (2010). *Circ.* **107**:327–39.
27. Song J, Teplova M, Ishibe-Murakami S, Patel DJ (2012). *Science* **335**, 709–712
28. Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH (1992). *Cell*; **71**:865-873.
29. Kriaucionis S, Heintz N (2009). *Science.* **324**(5929):929-30.
30. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009). *Science.* **324**(5929):930-5.
31. Wu H, Zhang Y (2011). *Genes Dev.* **25**, 2436–2452.
32. Cimmino L, Abdel-Wahab O, Levine RL, Aifantis I (2011). *Cell Stem Cell* **9**, 193–204.
33. Li B, Carey M, Workman JL (2007). *Cell.* **128**(4):707-19. Review.
34. Yuan GC, et al (2005). *Science.* **309**:626-630.
35. Lee W, et al (2007). *Nat. Genet.* **39**:1235-1244.
36. Mavrich TN, et al (2008). *Nature.* **453**:358–362.
37. Schones DE, et al (2008). *Cell.* **132**:887–898.
38. Shivaswamy S, et al (2008). *PLoS Biol.* **6**:e65.

39. Valouev A, et al (2008). *Genome Res* **18**:1051–1063.
40. Valouev A, et al (2011). *Nature*. **474**:516–520.
41. Van Holde KE (1988). *Chromatin* (New York: Springer-Verlag).
42. Roh TY, Ngau WC, Cui K, Landsman D, Zhao K (2004). *Nat Biotechnol*. **22**:1013–6.
43. Lee CK, Shibata Y, Rao B, Strahl BD, Lieb JD (2004). *Nat Genet*. **36**:900–5.
44. Bernstein BE, Liu CL, Humphrey EL, Perlstein EO, Schreiber SL (2004). *Genome Biol*. **5**:R62.
45. Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K, Felsenfeld G (2009). *Nat Genet*. **41**(8):941-5.
46. Segal E, Widom J (2009). *Trends Genet*. **25**, 335-343.
47. Escamilla-Del-Arenal M, Recillas-Targa F (2008). *Mol Cell Biol*. **28**(2):575-86.
48. Layon ME, Ackley CJ, West RJ, Lowrey CH (2007). *J Mol Biol*. **366**(3):737-44.
49. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001). *Nature*; **410**:116-120.
50. Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D (2007). *Epigenetics* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
51. Waddington CH (1957). (London: Allen & Unwin).
52. Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K (2008). *Nat Genet*. **40**(7):897-903.
53. Chung CW, Witherington J (2011). *J. Biomol. Screen*. **16**, 1170–1185.
54. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007). *Cell* **129**, 823–837.
55. Jack AP, Bussemer S, Hahn M, Pünzeler S, Snyder M, Wells M, Csankovszki G, Solovei I, Schotta G, Hake SB (2013). *PLoS One*. **8**(2):e51765.
56. Byvoet P, Shepherd GR, Hardin JM, Noland BJ (1972). *Arch Biochem Biophys* **148**:558–567
57. Rice JC, Allis CD (2001). *Curr Opin Cell Biol* **13**:263–273
58. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA & Shi Y (2004). *Cell*. **119**(7):941-53.
59. Shi YG, Tsukada Y(2013). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **5**(9).
60. Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y (2006). *Nature*. **439**(7078):811-6.
61. Yang M, Culhane JC, Szewczuk LM, Gocke CB, Brautigam CA, Tomchick DR, Machius M, Cole PA, Yu H (2007). *Nat Struct Mol Biol*. **14**(6):535 9.
62. Pesavento JJ, Yang H, Kelleher NL, Mizzen CA (2008). *Mol Cell Biol*. **28**(1):468-86.
63. Wozniak GG, Strahl BD (2014). *Biochim Biophys Acta*. 1874-9399(**14**)00053-4. Review.
64. Musselman CA, Lalonde ME, Côté J, Kutateladze TG (2012). *Nat Struct Mol Biol*. **19**(12):1218-27. Review.
65. Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM (2005). *Nature*. **438**:1176–1180.
66. Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD (2005). *Nature*.; **438**:1116–1122.

67. Stucki, M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005). *Cell* **123**, 1213–1226.
68. Fink M, Imholz D, Thoma F (2007). *Mol Cell Biol.* **27**(10):3589-600.
69. Sofueva S, Du LL, Limbo O, Williams JS, Russell P (2010). *Mol Cell Biol.***30**:4732–4743.
70. Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW, Clayton AL, Endicott JA, Mahadevan LC (2005). *Mol Cell.*;**20**:199–211.
71. Walter W, Clynes D, Tang Y, Marmorstein R, Mellor J, Berger SL (2008). *Mol Cell Biol.***28**:2840–2849.
72. Winter S, Simboeck E, Fischle W, Zupkovitz G, Dohnal I, Mechtler K, Ammerer G, Seiser C (2008). *EMBO J.* **27**:88–99.
73. Xhemalce B, Dawson MA, Bannister AJ (2011). In Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine (Weinheim: Wiley-VCH Verlag).
74. Allis CD, Glover CV, Bowen JK, Gorovsky MA (1980). *Cell.* **20**(3):609-17.
75. Park YJ, Dyer PN, Tremethick DJ, Luger K (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 24274–24282.
76. Jin C, Felsenfeld G (2007). *Genes Dev.* **21**, 1519–1529.
77. Henikoff S (2008). *Nat Rev Genet.* **9**:15–26.
78. Pusarla RH, Bhargava P (2005). *FEBS J.* **272**, 5149–5168.
79. Hake SB, Garcia BA, Duncan EM, Kauer M, Dellaire G, Shabanowitz J, Bazett-Jones DP, Allis CD, Hunt DF (2006b). *J Biol Chem.* **281**(1):559-68.
80. Hake SB, Allis CD (2006). *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**(17):6428-35. Review.
81. Ahmad K, Henikoff S (2002). *Mol Cell.* **9**(6):1191-200.
82. Mito Y, Henikoff JG, Henikoff S (2005). *Nat Genet.* **37**(10):1090-7.
83. Sullivan KF, Hechenberger M, Masri K (1994). *J Cell Biol.* **127**, 581–592
84. Faast R, Thonglairoam V, Schulz TC, Beall J, Wells JR, Taylor H, Matthaei K, Rathjen PD, Tremethick DJ, Lyons (2001). *Curr. Biol.* **11**, 1183–1187.
85. Zhang H, Roberts DN, Cairns BR (2005). *Cell* **123**, 219–231.
86. Rangasamy D, Berven L, Ridgway P, Tremethick DJ (2003). *EMBO J.* **22**, 1599–1607.
87. Rangasamy D, Greaves I, Tremethick DJ (2004). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 650–655.
88. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y (2004). *Cell* **116**, 51–61.
89. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E (2007). *Cell.* **128**(4):635-8. Review.
90. Baxevanis AD, Godfrey JE, Moudrianakis EN (1991). *Biochemistry* **30**, 8817–8823.
91. English CM, Maluf NK, Tripet B, Churchill ME, Tyler JK (2005). *Biochemistry.* **44**(42):13673-82.
92. Sogo JM, Stahl H, Koller T, Knippers R (1986). *J Mol Biol* **189**:189–204
93. Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasani-zadeh S (2003). *Genes Dev* **17**:1870–1881
94. Annunziato AT, Seale RL (1984). *Nucleic Acids Res.* **12**, 6179–6196.
95. Leffak M (1988). *Biochemistry* **27**, 686–691.
96. Ehrenhofer-Murray AE (2004). *Eur J Biochem* **271**:2335–2349

97. Probst AV, Dunleavy E & Almouzni G (2009). *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:192–206
98. Xu M, Long C, Chen X, Huang C, Chen S, Zhu B (2010). *Science* **328**:94–98
99. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002). *Cell* **108**: 475-487.
100. Roberts CWM, Orkin SH (2004). *Nat Rev Cancer* **4**: 133-142.
101. de la Serna IL, Ohkawa Y, Imbalzano AN, (2006). *Nature Review in Genetics* **7**:461-73.
102. Schwartz YB, Pirrotta V (2007).
103. Schuettengruber B, Cavalli, G (2009). *Development* **136**, 3531–3542.
104. Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Prasad-Sinha J, Stepanik V, Zlobin A, Diaz MO, Scacheri PC, Harte PJ (2009). *Development*. **136**, 3131 3141.
105. Cavalli G, Paro R (1998). *Cell* **93**,505-518.
106. Maurange C, Paro R (2002). *Genes Dev.* **16**,2672 -2683.
107. Pelegri F, Lehmann R (1994). *Genetics* **136**,1341 -1353.
108. Poux S, Kostic C, Pirrotta V (1996). *EMBO J.* **15**,4713 -4722.
109. Rank G, Prestel M, Paro R (2002). *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8026 -8034.
110. Ptashne M (2007). *Curr Biol* **17**:r233–r236.
111. Hansen KH, Bracken AP, Pasini D, Dietrich N, Gehani SS, Monrad A, Rappsilber J, Lerdrup M, Helin K. *Nat Cell Biol.* **10**(11):1291-300.
112. Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS (2008). *Science* **319**, 1787–1789.
113. Struhl K (2007). *Nat Struct Mol Biol* **14**:103–105.
114. Natoli G, Andrau JC (2012). *Annu Rev Genet* **46**:1–19.
115. Rinn JL, Chang HY (2012). *Annu Rev Biochem* **81**:145–166.
116. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, et al (2009). *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:11667–11672.
117. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, et al (2010). *Nature* **464**:1071–1076.
118. Zhao J, Ohsumi TK, Kung JT, Ogawa Y, Grau DJ, Sarma K, Song JJ, Kingston RE, Borowsky M, Lee JT (2010). *Mol Cell* **40**:939–953.
119. Ng SY, Johnson R, Stanton LW (2012). *EMBO J* **31**:522–533.
120. da Rocha ST, Boeva V, Escamilla-Del-Arenal M, Ancelin K, Granier C, Matias NR, Sanulli S, Chow J, Schulz E, Picard C, Kaneko S, Helin K, Reinberg D, Stewart AF, Wutz A, Margueron R, Heard E (2014). *Mol Cell.* **53**(2):301-16.
121. Kaneko S, Bonasio R, Saldaña-Meyer R, Yoshida T, Son J, Nishino K, Umezawa A, Reinberg D (2014). *Mol Cell.* **53**(2):290-300.
122. Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT (2008). *Science* **322**:750–756.
123. Simon JA, Kingston RE (2009). *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**(10):697-708. Review.
124. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002). *Science.* **298**(5595):1039-43.
125. Lee JT, Lu N (1999). *Cell.* **99**(1):47-57.
126. Tian D, Sun S, Lee JT (2010). *Cell.* **143**(3):390-403.
127. Sun S, Del Rosario BC, Szanto A, Ogawa Y, Jeon Y, Lee JT (2013). *Cell.* **153**(7):1537-51.

128. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al (2009). *Nature*, **458**, pp. 223–227
129. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY (2007). *Cell*. **129**(7):1311-23.
130. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, et al (2010). *Proc Natl Acad Sci USA*. **107**:21931–21936.
131. De Santa F, Barozzi I, Mietton F, Ghisletti S, Polletti S, Tusi BK, Muller H, Ragoussis J, Wei CL, Natoli G (2010). *PLoS Biol* **8**:e1000384.
132. Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, et al (2010). *Nature* **465**:182–187.
133. Hah N, Danko CG, Core L, Waterfall JJ, Siepel A, Lis JT, Kraus WL (2011). *Cell* **145**:622–634.
134. Banaszynski LA, Allis CD, Lewis PW (2010). *Dev Cell*. **19**(5):662-74.
135. Melo CA, Drost J, Wijchers PJ, van de Werken H, de Wit E, Vrieling JA, Elkon R, Melo SA, Leveille N, Kalluri R, et al (2012). *Mol Cell* **49**:524–535.
136. Lam MT, Cho H, Lesch HP, Gosselin D, Heinz S, Tanaka-Oishi Y, Benner C, Kaikkonen MU, Kim AS, Kosaka M, et al (2013). *Nature* **498**:511–515.
137. Li W, Notani D, Ma Q, Tanasa B, Nunez E, Chen AY, Merkurjev D, Zhang J, Ohgi K, Song X, et al (2013). *Nature* **498**:516–520.
138. Lapidot M & Pilpel Y (2006). *EMBO Rep* **7**:1216–1222.
139. Magistri M, Faghihi MA, St Laurent 3rd G & Wahlestedt C (2012). *Trends Genetic* **28**:389–396.
140. Martens JA, Laprade L, Winston F (2004). *Nature* **429**:571–574.
141. Su H, Trombly MI, Chen J, Wang X (2009). *Genes Dev*; **23**:304- 17.
142. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004). *Science*; **305**:1437-41.
143. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd, Parker R, Hannon GJ (2005). *Nat Cell Biol* ; **7**:1261-6.
144. Grewal SI (2010). *Curr Opin Genet Dev*. **20**:134–41.
145. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al (2003). *Nature*; **425**:415–9.
146. Hutvagner G, Zamore PD (2002). *Science*. **297**:2056–60.
147. Chuang JC, Jones PA (2007). *Pediatr Res*. **61**: 24R–9R.
148. Carthew RW, Sontheimer EJ (2009). *Cell*; **136**:642–55.
149. Baylin SB, Jones, PA (2011). *Nat. Rev. Cancer* **11**, 726–734.
150. Brennecke J, et al (2007). *Cell*. **128**:1089.
151. Ambros V (2004). *Nature*; **431**:350.
152. Bartel DP, Chen CZ (2004). *Nat Rev Genet*; **5**:396-400.
153. Iorio MV, Croce CM (2012). *Cancer J*. **18**(3):215-22.
154. Hemberger M, Dean W, Reik W (2009). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **10**, 526–537.
155. Bonasio R, Tu S, Reinberg D (2010). *Science*; **330**:612-616.
156. Goll MG, Bestor TH (2005). *Annu Rev Biochem*. 481-514. Review.
157. Del Vecchio D, Ninfa AJ, Sontag ED (2008). *Mol Syst Biol*. **4**:161.
158. Moazed D (2009). *Nature*. 457:413.
159. Cairns BR (2009). *Nature*. 461:193.

160. Talbert PB, Henikoff S (2010). *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**:264.
161. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA (2002). *Science.* **297**(5588):1833-7.
162. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N (1996). *Nature.* **379**(6561):131-7.
163. Zhu B, Reinberg D (2011). *Cell Res.* **21**(3):435-41.
164. Yamasu K, Senshu T (1990). *J Biochem;* **107**:15-20.
165. Jackson V (1990). *Biochemistry;* **29**:719-731.
166. Benson LJ, Gu Y, Yakovleva T, et al (2006). *J Biol Chem;* **281**:9287-9296.
167. English CM, Adkins MW, Carson JJ, Churchill ME, Tyler JK (2006). *Cell.* **127**(3):495-508.
168. Escamilla-Del-Arenal M, da Rocha ST, Spruijt CG, Masui O, Renaud O, Smits AH, Margueron R, Vermeulen M, Heard E (2013). *Mol Cell Biol.* **33**(24):5005-20.
169. Hanahan D, Weinberg RA (2011). *Cell* **144**, 646–674.
170. Escamilla-Del-Arenal M, da Rocha ST, Heard E (2011). *Hum Genet.* **130**(2):307-27. Review.
171. Sandoval J, Esteller, M (2012). *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 50–55.
172. Wilson BG, Roberts CW (2011). *Nat. Rev. Cancer* **11**, 481–492.
173. Rodriguez-Paredes M, Esteller M (2011). *Nat. Med.* **17**, 330-339.
174. Kasinski AL, Slack FJ (2011). *Nat. Rev. Cancer* **11**, 849–864.
175. Wigler M, Levy D, Perucho M (1981). *Cell.* **24**:33.
176. Kanai Y, Ushijima S, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S (2003). *Cancer Lett.* **192**, 75–82.
177. Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q (2002). *Cancer Res.* **62**, 4992–4995.
178. Jones PA, Baylin SB (2007). *Cell,* **128**:683-692.
179. Hatzia Apostolou M, Iliopoulos D (2011). *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1681-1702.
180. Shen L, et al (2007). *PLoS Genet.* **3**:2023–2036.
181. Illingworth R, et al (2008). *PLoS Biol.* **6**:e22.
182. De Carvalho DD, You JS, Jones PA (2010). *Trends Cell Biol.* **20**, 609–617.
183. Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Suzuki A, Komune S, Miyano S, Mori M (2011). *Cancer Res.* **71**(20):6320-6.
184. Wang KC, Chang HY (2011). *Mol. Cell* **43**, 904–914.
185. Faghihi MA, Wahlestedt C (2009). *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:637 643.
186. Levenson JM, Sweatt JD (2005). *Nat Rev Neurosci* **6**: 108–118.
187. Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P (2008). *Neuron* **60**: 961–974.
188. Dulac C (2010). *Nature* **465**: 728–735.
189. Nestler EJ (2011). *Sci Am* **305**: 76–83.
190. Wijmenga C, Hansen RS, Gimelli G, Bjorck EJ, Davies EG, Valentine D, Belohradsky BH, van Dongen JJ, Smeets DF, van den Heuvel LP, et al. (2000). *Hum. Mutat.* **16**, 509–517.
191. Buiting K (2010). *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* **154C**(3):365-76.
192. Martínez-Frías ML (2010). *J Med Genet ;* **47**:73- 80.

193. Kuzawa CW, Sweet E (2009). *Am J Hum Biol*; **21**:2-15.
194. Thayer ZM, Kuzawa CW (2011). *Epigenetics* ; **6**:798-803.
196. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA (2010). *Nat. Biotechnol.* **28**, 1069–1078.
197. Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Majer CR, Sneeringer CJ, Song J, Johnston LD, Scott MP, Smith JJ, Xiao Y, et al (2011). *Cancer Cell* **20**, 53–65.
198. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I, et al (2010). *Nature* **468**, 1067–1073.
199. Nicodeme E, Jeffrey KL, Schaefer U, Beinke S, Dwell S, Chung CW, Chandwani R, Marazzi I, Wilson P, Coste H, et al (2010). *Nature* **468**, 1119–1123.
200. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, Kastritis E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J, et al (2011). *Cell* **146**, 904–917.
201. Khan O, La Thangue NB (2008). *Nat Clin Pract Oncol*; **5**:714-726.
202. Marson CM (2009). *Anticancer Agents Med Chem*, **9**:661-692.
203. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N, et al (2011). *Cancer Discov.* **5**:598–607.
204. Matei DE, Nephew KP (2010). *Gynecol. Oncol.* **116**, 195–201.
205. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB (1999). *Nat Genet*, **21**:103-107.
206. Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa JP, Herman JG, March TH, Baylin SB (2003). *Cancer Res*, **63**:7089-7093.
207. Belinsky SA, Grimes MJ, Picchi MA, Mitchell HD, Stidley CA, Tesfaigzi Y, Channell MM, Liu Y, Casero RA Jr, Baylin SB, Reed MD, Tellez CS, March TH (2011). *Cancer Res*, **71**:454-462.
208. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000). *Nature*. **403**:501.
209. Duffié R, Bourc'his D. 2013. *Curr Top Dev Biol.* **104**:293-328. Review.
210. Zacharioudakis I, Gligoris T, Tzamarias D (2007). *Curr Biol.* **17**:2041.
211. Felsenfeld G, Groudine M, 2003. *Nature* **23**;421(6921):448-53. Review.
212. Turner BM (2002). *Cell.* **111**(3):285-91. Review.
213. Jenuwein T, Allis CD (2001). *Science* **293**: 1074–1080.
214. Su D, Hu Q, Li Q, Thompson JR, Cui G, Fazly A, Davies BA, Botuyan MV, Zhang Z, Mer G (2012). *Nature*. **483**(7387):104-7.

Semblanza del Dr. Martín Escamilla del Arenal.



Nació el 13 de junio de 1974 en la Ciudad de México. Es Químico de la Facultad de Química por la Universidad Nacional Autónoma de México (2002) y doctor en Ciencias Biomédicas por la Universidad Nacional Autónoma de México (2008). Su tesis la realizó en el laboratorio del Dr. Félix Recillas Targa en el Instituto de Fisiología Celular. Estudiando el efecto que la cromatina tiene en la regulación transcripcional del “enhancer” alpha-globina, en pollo. Realizó una primera estancia post-doctoral en el laboratorio de la Dra. Edith Heard en el Instituto Cuire en Paris, Francia (2008-2013). Su estudio consistió en

identificar y caracterizar proteínas involucradas en el proceso de Inactivación del Cromosoma X-inactivo, en ratón. Actualmente se encuentra realizando una segunda estancia post-doctoral en el laboratorio del Dr. Stavros Lomvardas en la Universidad de California en San Francisco (UCSF), USA. Su estudio consiste en la caracterización molecular de los mecanismos involucrados en la selección génica en el desarrollo del sistema olfatorio, en ratón. Su trabajo experimental se ha publicado en 8 artículos internacionales y 2 nacionales. Ha co-dirigido 1 tesis de licenciatura.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 289-304, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014).
(<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

IMPORTANCIA DEL CHILE SILVESTRE (*Capsicum annum*) COMO RECURSO GENÉTICO DE MÉXICO

THE WILD-TYPE RELATIVES OF CHILE (*Capsicum annum*) A VALUABLE GENETIC RESOURCE IN MÉXICO

Sergio Hernández Verdugo

Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa.
Sergioh2002mx@yahoo.com.mx

Resumen

En México se han domesticado una gran cantidad de especies cultivadas, entre las que se encuentran el chile (*Capsicum spp.*). Como consecuencia de los procesos de domesticación, las plantas cultivadas mantienen menores niveles de variación genética y son más susceptibles a plagas y enfermedades que sus parientes silvestres más cercanos. Los parientes silvestres de las plantas cultivadas son una fuente importante de genes de resistencia contra factores bióticos y abióticos que limitan la producción agrícola. Estudios en poblaciones de chile silvestre (*Capsicum annum*) del noroeste de México y variedades modernas efectuados con isoenzimas, RAPDs y microsatélites, indicaron que el proceso de

domesticación ha reducido la variación genética en los cultivares de esta especie. Las poblaciones silvestres de Chile mostraron elevados niveles de resistencia al geminivirus huasteco del Chile, indicando que las poblaciones de *Capsicum annuum* silvestre son un recurso genético valioso que puede ser utilizado como posible fuente de resistencia para futuros programas de mejoramiento genético de esta planta cultivada.

Palabras clave: *Capsicum annuum* silvestre, domesticación, recursos genéticos, variación genética, resistencia a virus.

Abstract

In Mexico had been domesticated a large number of cultivated species, included the chili pepper (*Capsicum* spp.). As a result of domestication process, the cultivated plants maintain lower levels of genetic variation and they are more susceptible to pests and diseases than their wild close relatives. The wild relatives of cultivated plants maintain high levels of genetic variation and they are a valuable genetics resource of resistant genes to biotic and abiotic limiting factors of the farming production. Studies on wild chili peppers (*Capsicum annuum*) populations from northwestern Mexico carried out by isozymes, RAPDs and microsatellites indicated that the domestication process has decreased the genetic variation in the modern cultivars of this species. Wild chili pepper populations showed high levels of resistance to geminivirus pepper huasteco virus, indicating that wild *Capsicum annuum* populations are a valuable genetics resource which can use a source of resistance in breeding programmes.

Keywords: wild *Capsicum annuum*, domestication, genetic resources, genetic variation, resistance to virus.

Introducción

México es considerado uno de los países con mayor diversidad vegetal en el mundo y uno de los principales centros de domesticación de las plantas cultivadas. Aquí se han domesticado una gran cantidad de especies vegetales que forman parte importante de la alimentación mundial. Dentro de las primeras plantas domesticadas en el continente americano está el Chile, *Capsicum*

(Solanaceae), cultivo que ha jugado un papel relevante en la cultura y la alimentación de la población mexicana desde épocas prehispánicas [1].

Cuando observamos la gran diversidad de formas, colores y tamaños de los frutos de los diferentes tipos de chiles cultivados, se nos hace difícil imaginarnos que puedan tener alguna relación con los frutos pequeños, rojos y picantes de las plantas que crecen de forma silvestre en condiciones naturales (Figura 1). Estas grandes diferencias entre las plantas de chile cultivadas y sus progenitores o parientes silvestres más cercanos, son el resultado del esfuerzo que de manera constante durante miles de años la especie humana ha dedicado a la transformación de las especies vegetales con las que ha convivido.



Figura 1. Frutos pequeños, rojos y picantes de las plantas que crecen de forma silvestre en condiciones naturales.

La interacción establecida durante milenios entre el ser humano y las plantas cultivadas ha hecho a ambos mutuamente dependientes entre sí, a tal grado, que la mayoría de nuestras plantas domesticadas no podrían sobrevivir sin la ayuda del hombre, y la civilización actual no podría sobrevivir sin las plantas cultivadas.

Las diferentes presiones de selección a las que han sido sometidas las plantas cultivadas durante los procesos de domesticación, han afectado

principalmente sus sistemas naturales de apareamiento y mecanismos de dispersión, sus caracteres morfológicos, fisiológicos, y los niveles de variación y estructura genética de sus poblaciones [2, 3].

Los cambios morfológicos más notorios ocurren en las partes o estructuras de la planta que son de interés humano, como el tamaño, color y forma de los frutos. Una de las características fisiológicas que han sido modificadas en mayor grado por la selección artificial es la pérdida de latencia de sus semillas. Generalmente, las plantas domesticadas mantienen niveles de diversidad genética más bajos que sus parientes silvestres, y frecuentemente esta variación se distribuye en mayor proporción entre sus poblaciones [3]. Esta mayor uniformidad genética de las plantas domesticadas conduce a que presenten mayor susceptibilidad a plagas y enfermedades, las cuales constituyen una de las limitantes más fuertes en los sistemas de producción agrícolas modernos.

El chile pertenece al género *Capsicum* (Solanacea). Este género está conformado por alrededor de 30 especies distribuidas desde el sur de Los Estados Unidos, hasta el norte de Argentina [4]. Del género han sido domesticadas *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens* [4]. En México se cultivan todas estas especies, excepto *C. baccatum*. De las especies domesticadas, *C. annuum* es la de mayor importancia económica, se cultiva ampliamente en todo el mundo y se considera que fue domesticada en México [5]. Esta especie es la que presenta la mayor variación en tamaño, color y forma de los frutos. A ella pertenecen los chiles “anchos”, “serranos”, “jalapeños”, “Anaheim” y “morrón”, entre otros (Figura 2).

Las plantas de chile silvestre (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser y Pickersgill), conocidas comúnmente como chiles “chiltepines” o “piquines” son perennes, herbáceas o trepadoras que pueden alcanzar 5 m de altura [6] (Figura 3). Sus frutos pequeños, rojos y picantes son comidos por las aves las cuales dispersan sus semillas (Figura 4). Las poblaciones de chile silvestre se distribuyen ampliamente por todo el territorio nacional. Es posible encontrarlas en sitios imperturbados de la selva baja caducifolia, así como a orillas de los caminos, en huertos, potreros y bajo la vegetación remanente a orillas de los campos de cultivo, generalmente en altitudes menores de 1000 m [4].



Figura 2. *C. annuum* es la especie es la que presenta la mayor variación en tamaño, color y forma de los frutos.



Figura 3. Plantas de chile silvestre conocidas comúnmente como chiles “chiltepines” o “piquines” son perennes, herbáceas o trepadoras que pueden alcanzar 5 m de altura



Figura 4. Frutos pequeños, rojos y picantes

Uno de los principales motivos para estudiar los parientes silvestres de las plantas cultivadas es que estos constituyen un reservorio invaluable de genes que puede ser utilizado en la solución de problemas agrícolas, proporcionando resistencia genética contra plagas y enfermedades, o aumentando la cantidad y la calidad de la producción de los cultivares modernos [7].

Efecto de la domesticación sobre la variación genética en poblaciones de chile cultivado

Durante el curso de la domesticación, las plantas cultivadas son sometidas a los diferentes procesos evolutivos de una manera intensa y diversa. Las personas dedicadas a la agricultura tienen la costumbre de dejar una cantidad de semillas muy pequeña procedente de las plantas con las mejores características para la siembra del año siguiente, esto conduce a que sólo un número muy reducido de individuos contribuya con sus genes a la siguiente generación. Esta práctica efectuada durante los 10 o 15 000 años estimados desde el inicio de la domesticación permite esperar una severa pérdida de variación genética en las poblaciones de las plantas cultivadas. La pérdida de variación genética es mayor conforme el método de mejoramiento es más eficiente. Así, los parientes silvestres mantienen cantidades mayores de variación genética, disminuye en las variedades

locales o razas criollas, hasta hacerse muy reducida en los cultivares modernos (Figura 5).

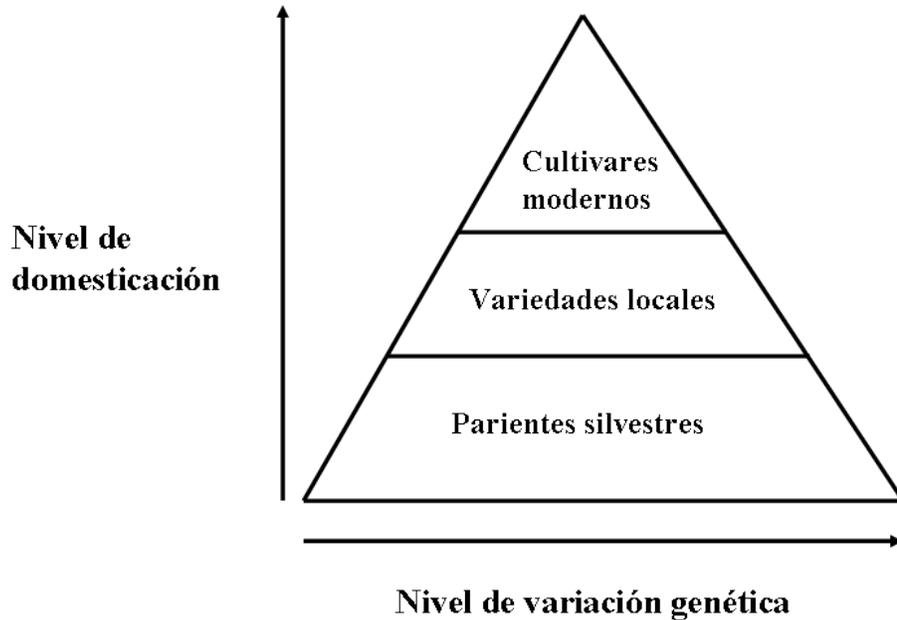


Figura 5. Relación entre el nivel de domesticación y el nivel de la variación genética mantenida en las poblaciones de plantas silvestres y cultivadas.

Una razón adicional por la cual las variedades modernas o híbridos poseen menores cantidades de variación genética que las razas locales es que el mercado pide o exige a los productores uniformidad en el tamaño, forma y color de los frutos de chile o cualquier otro cultivo. La mayor variación genética mantenida en las variedades locales origina que cuando éstas se siembran, se cosechen frutos que presentan variación o diferencias en el tamaño, forma o color de sus frutos. Esta variación en los frutos es castigada en el mercado mediante una reducción significativa del precio de la cosecha, en comparación con los precios más elevados de los frutos de características uniformes producidas por las variedades modernas o híbridas.

Las variedades híbridas tienen en contra el elevado costo de su semilla y la necesidad del productor de comprarla cada año que la siembra. En cambio, la semilla de las variedades locales es mucho más barata y el campesino puede utilizar la del ciclo anterior y guardar para siembras futuras.

Los efectos de la domesticación sobre la variación genética en poblaciones cultivadas de chile se ilustran con los resultados de estudios efectuados con

isoenzimas, RAPDs y microsatélites en poblaciones silvestres y domesticadas [8, 9, 10].

Isoenzimas

El número promedio por *locus* polimórfico (*A*) en las poblaciones silvestres fue de 2.7 y de 2.6 para las domesticadas (Cuadro 1). El porcentaje promedio de *loci* polimórficos (*P*) fue 90.8 en las poblaciones silvestres y de 84.6 para las domesticadas. La heterocigosis promedio observada (*Ho*) y esperada (*He*) fue 0.296 y 0.445 para las poblaciones silvestres y de 0.259 y 0.408 para las poblaciones cultivadas (Cuadro 1). Estos resultados indican que las poblaciones silvestres y cultivadas de *C. annuum* mantienen elevados niveles de variación genética dentro y entre de sus poblaciones y que el proceso de domesticación ha producido poca erosión genética en los cultivares modernos de Chile.

Cuadro 1. Variación genética estimadas con isoenzimas, RAPDs y microsatélites en poblaciones silvestres y domesticadas de *Capsicum annuum*.

Poblaciones	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>
Isoenzimas				
Silvestres	2.7	90.8	0.296	0.445
Domesticadas	2.6	84.6	0.259	0.408
RAPDs				
Silvestres		34.2		0.069
Domesticadas		37.7		0.081
Microsatélites				
Silvestres	3.6	89.3	0.225	0.466
Domesticadas	3.1	93.2	0.237	0.440

Sin embargo, en las poblaciones silvestres se detectaron 36 alelos diferentes, mientras que en las poblaciones cultivadas se detectaron 28, 32 y 35 en las poblaciones de Chile “morrón”, “jalapeños” y “serranos”, respectivamente. Estos resultados indican que la domesticación ha producido una reducción importante en el número de alelos en las poblaciones domesticadas y esta pérdida es mayor en los chiles dulces tipo “morrón”, seguido de los “jalapeños” y “serranos” (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de alelos conservados (%) en las poblaciones silvestres y domesticadas (Serrano, Jalapeño Y Morrón) de Chile (*Capsicum annuum*).

No. de alelos	Silvestres	Domesticadas Serrano	Jalapeño	Morrón
36	36 (100)	35 (97)	32 (89)	28 (78)

RAPDs

Se utilizaron diez iniciadores seleccionados que produjeron un total de 166 bandas, todas ellas polimórficas en las poblaciones silvestres. En las poblaciones domesticadas se registraron 126 bandas, de las cuales 125 fueron polimórficas. Todas las bandas registradas se presentaron en las poblaciones silvestres, pero 40 bandas presentes en las poblaciones silvestres estuvieron ausentes en las poblaciones domesticadas. El porcentaje de polimorfismo promedio en las poblaciones silvestres fue de 31.2 y el de las domesticadas de 34.7 (Cuadro 1). La heterocigosis esperada en las poblaciones silvestres fue 0.069 y de las cultivadas 0.081. La diversidad genética total de las poblaciones silvestres fue 0.165 y de las cultivadas 0.131 (Cuadro 1). Estos resultados indican que el proceso de domesticación ha producido pequeña erosión genética en los cultivares modernos de Chile.

El análisis de componentes principales basado en las frecuencias de las 166 bandas permitió observar claramente los efectos de la domesticación en las tres variedades de Chile analizadas en el presente estudio. Como puede observarse en la Figura 6, las tres poblaciones cultivadas se distribuyen en la parte central de la gráfica construida con los componentes principales 2 (CP-2) y 3

(CP-3). Esto significa que las poblaciones domesticadas poseen sólo una parte de la variación genética presente en las poblaciones silvestres. Las 40 bandas presentes en las poblaciones silvestres y ausentes en las poblaciones cultivadas representan una pérdida de 24.1 % de alelos en estas poblaciones de Chile (*Capsicum annuum*).

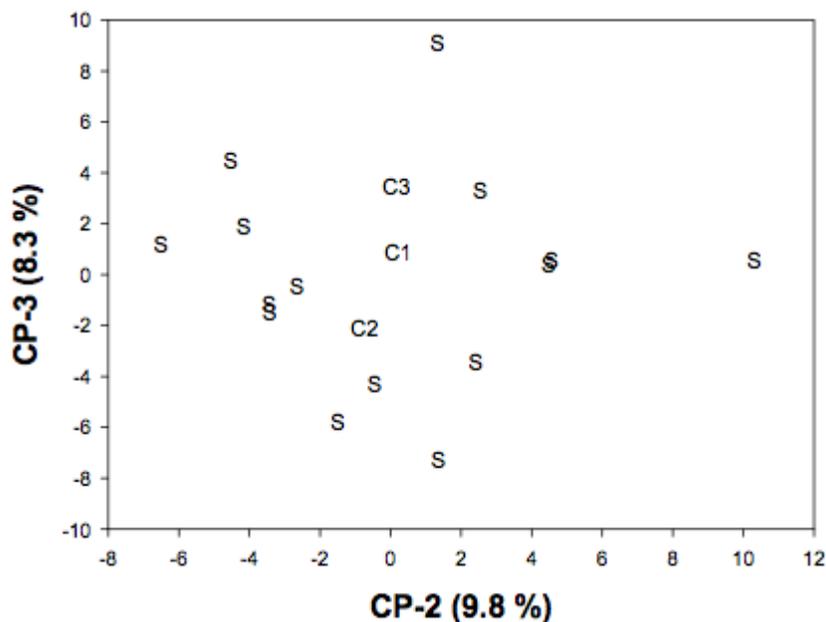


Figura 6. Gráfica entre el componente principal 2 (CP-2) y el componente principal 3 (CP-3) estimados con las frecuencias alélicas con marcadores moleculares RAPDs para 15 poblaciones silvestres (S) y tres domesticadas de Chile (C1 = serrano; C2 = jalapeño; C3 = morrón).

Microsatélites

En las poblaciones silvestres el número promedio por locus polimórfico (A), El porcentaje promedio de *loci* polimórficos (P), la heterocigosis promedio observada (H_o) y esperada (H_e) fueron 3.6, 89.3, 0.225 y 0.446, respectivamente. En las poblaciones cultivadas los valores de estos descriptores de la variación genética fueron 3.1 (A), 93.2 (P), 0.237 (H_o) y 0.440 (H_e) (Cuadro 1).

Efecto de la domesticación sobre la germinación de las semillas de chile silvestre

Normalmente las semillas de las plantas silvestres tienen mecanismos que les permiten detectar el momento cuando las condiciones son propicias para germinar y que las plántulas puedan crecer, desarrollarse adecuadamente y reproducirse. Cuando las condiciones no les son propicias, las semillas no germinan y permanecen en estado de latencia hasta que sea el tiempo adecuado. La luz y la temperatura son de los factores del ambiente más importantes que le indican a las plantas si deben o no germinar.

Los efectos de la luz y la temperatura sobre la germinación de las semillas de chile silvestre se ilustran con los resultados de un experimento efectuado por Hernández-Verdugo *et al.* [11], donde se pusieron a germinar semillas de poblaciones de chile silvestre y cultivado en diferentes condiciones de luz y temperatura. Los resultados indicaron que las semillas de chile silvestre mostraron una escasa o nula germinación en condiciones de oscuridad y temperatura constante. Cuando las semillas estuvieron bajo luz y temperatura fluctuante aumentaron significativamente su germinación. (Figura 7). Estos resultados indican que las semillas de chile silvestre tienen mecanismos de latencia que pueden ser desactivados por la luz y la temperatura. En cambio, las semillas de chiles cultivados germinaron en todas las condiciones de germinación, indicando que los procesos de domesticación han eliminado la latencia en las semillas de los chiles cultivados.

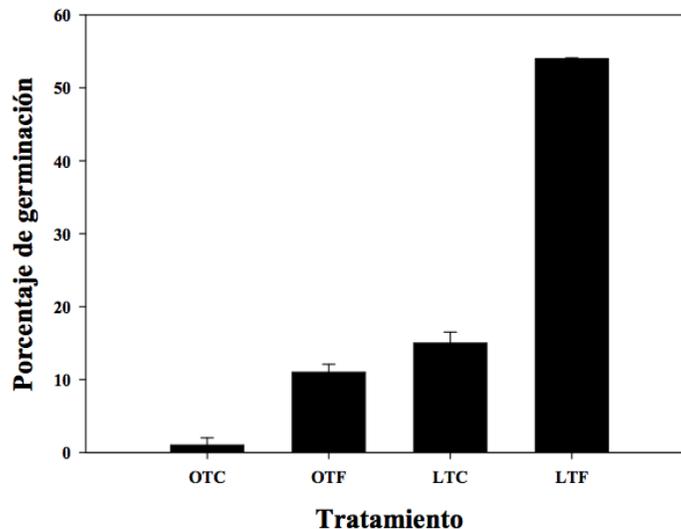


Figura 7. Germinación de semillas de chile silvestre (*Capsicum annuum*) en condiciones de oscuridad y temperatura constante de 25° C (OTC), oscuridad y temperatura fluctuante

de 25 - 35° C (OTF), luz y temperatura constante (LTC) y luz y temperatura fluctuante (LTF).

El chile silvestre como un recurso genético

Una razón de gran importancia práctica y económica para estudiar los parientes silvestres de las plantas cultivadas es que estos son un valioso acervo genético que puede ayudar a la solución de problemas relacionados con la producción agrícola, tales como tolerancia o resistencia a plagas y enfermedades, así como la posibilidad de aumentar la cantidad y calidad de la producción [7]. Pueden ser fuente de resistencia genética contra enfermedades importantes, como es el caso del virus huasteco del chile, transmitidos por la “mosquita blanca” (*Bemisia tabaci*). Es importante señalar que hasta la fecha no existen variedades comerciales resistentes contra este patógeno.

Normalmente los agricultores han tratado de controlar estos patógenos mediante el uso de plaguicidas en contra de su vector, la “mosquita blanca”. Este método ha resultado inútil y contraproducente ya que ha incrementado los costos de producción de los cultivos hortícolas y la contaminación por plaguicidas de los valles agrícolas de México. Una solución alternativa para controlar estas virosis sería mejorar las variedades comerciales de estos cultivos, incorporando resistencia genética contra estos patógenos.

En un estudio efectuado en 13 poblaciones de chile silvestre [12] donde los síntomas del virus huasteco de chile (PHV) se midió de una escala de 0 a 10, se encontró gran variación entre y dentro de las poblaciones. Dos poblaciones destacaron por sus bajos niveles promedio de los síntomas con algunas plantas completamente asintomáticas (Figura 8).

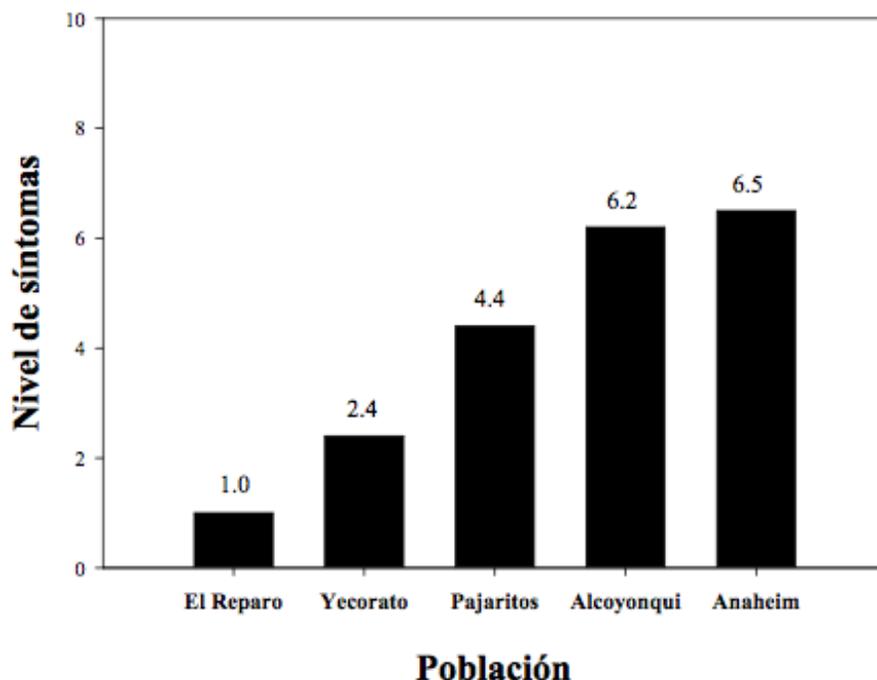


Figura 8. Nivel de síntomas al virus PHV en dos poblaciones de Chile (*Capsicum annuum*) silvestre y la domesticada Anaheim.

Al cuantificar las cantidades de ADN viral en las plantas de estas poblaciones se encontró que las poblaciones silvestres con menores síntomas de la enfermedad tuvieron cantidades de ADN viral 1000 veces menor que la variedad domesticada (Anaheim) (Cuadro 3). Esto indica que las poblaciones de Chile silvestre tolerantes o resistentes al virus PHV tienen mecanismos que dificultan la reproducción de los virus dentro de sus células.

Cuadro 3. Cantidades de ADN viral determinado por hibridización “dot blot”. Las medias son expresadas en valores de densidad integrados (V.D.I.). Valores con la misma letra no son diferentes a $p < 0.05$.

Población	V.D.I.
El Reparó	5.3×10^{-5} (a)
Yecorato	1.4×10^{-5} (a)
Pajaritos	1.4×10^{-4} (ab)
Alcoyonqui	3.5×10^{-3} (bc)
Anaheim	3.5×10^{-2} (c)

El chile silvestre, un recurso amenazado

Una de las amenazas más graves para la conservación en condiciones naturales de este invaluable recurso genético es la destrucción o fragmentación de su hábitat con fines de incorporar nuevas tierras a la agricultura, construcción de represas y carreteras, principalmente (Figura 9). De las 14 poblaciones estudiadas en el estado de Sinaloa, cinco (36 %) de ellas se destruyeron en los siguientes tres años de iniciado los presentes trabajos de investigación. De las cinco poblaciones perdidas, cuatro fueron por la deforestación de los sitios donde estaban las plantas para incorporar las tierras a la agricultura y la ganadería. De la desaparición de la población restante se desconocen sus causas.



Figura 9. El chile silvestre, un recurso amenazado.

Referencias

1. Long-Solís J. (1986). *Capsicum* y cultura: la historia de chile. Fondo de Cultura Económica, México.
2. Harlan, J. R., De Wet, J. M. J. y Price, E. G. (1973). *Evolution* 27, 311-325.
3. Hamrick, J. T. y Godt, M. J. W. (1997). *Crop Science* 37, 26-30.
4. Hernández-Verdugo, S., Dávila, P. y Oyama, K. (1999). *Bol Soc Bot Méx* 64, 65-84.
5. Pickersgill, B. (1971). *Evolution* 25, 683–691.
6. Hernández-Verdugo, S., Porras F., López-España R., Villarreal-Romero M., Parra-Terraza S. y Osuna-Enciso T. (2012). *Polibotánica* 33, 175-191.
7. Hernández-Verdugo, S., Guevara-González, R. G., Rivera-Bustamante, R. F., Vázquez-Yanez C. y Oyama K (1998). *Bol Soc Bot Méx* 62, 171-181.
8. Hernández-Verdugo, S., Luna-Reyes R., y Oyama, K (2001a). *Plant Syst Evol* 226, 129-142.

9. Oyama, K., Hernández-Verdugo, S., Sánchez, C., González-Rodríguez, A., Sánchez-Peña, P., Garzón-Tiznado, J. A., y Casas A. (2006). *Crop Evol* 53, 553-562.
10. Pacheco-Olvera A., Hernández-Verdugo, S. Rocha-Ramírez V., González-Rodríguez, A., y Oyama, K. (2012). *Crop Science* 52, 231-241.
11. Hernández-Verdugo, S., Oyama, K. y Vázquez-Yanes, C. (2001b). *Plant Ecol* 155, 245-257.
12. Hernández-Verdugo S., Guevara-González, R. G., Rivera-Bustamante R. F. y Oyama, K. (2001c). *Euphytica* 122, 31-36.

Semblanza del Dr. Sergio Hernández Verdugo



El Dr. Sergio Hernández Verdugo hizo la Licenciatura en la Facultad de Agronomía de la UAS, la Maestría en la Facultad de Ciencias (Biología) de la UNAM y el Doctorado en el Instituto de Ecología de la UNAM. Es Profesor Investigador de la Facultad de Agronomía de la UAS, Tiempo Completo Titular C. Ha dirigido cerca de 20 tesis de Licenciatura, Maestría y Doctorado. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores nivel II. Ha publicado más de 50 artículos, considerando artículos científicos originales, en revistas de difusión y capítulos de libros. Pertenece al Sistema de Estímulos al Desempeño Académico Nivel V, tiene Perfil Académico Deseable en el PROMEP. Su línea de investigación es el estudio de los recursos genéticos vegetales para la agricultura y la alimentación.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 305-319, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014).

(<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

RITMOS CIRCADIANOS Y RESPUESTA INMUNE

CIRCADIAN RHYTHMS AND IMMUNE RESPONSE

Jacqueline Oliva Ramírez, María Maximina B. Moreno Altamirano,
F. Javier Sánchez García.

Laboratorio de Inmunorregulación, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Casco de santo Tomás C.P. 11340, México D.F., México

Resumen

El movimiento de rotación de nuestro planeta ha condicionado el desarrollo de patrones cíclicos en la fisiología de prácticamente todos los seres vivos, que se repiten aproximadamente cada 24 horas y que dependen de los ciclos naturales de luz y oscuridad. A este comportamiento cíclico se le denominó "ciclo circadiano", del Latín *circa*, "cerca a" y *diem*, "día". Los ciclos circadianos han sido estudiados desde finales de los 60's, cuando Franz Halberg usó por primera vez este término. Actualmente se conocen algunos de los genes, proteínas e interacciones proteína-proteína que regulan a los ciclos circadianos así como algunos de sus inductores o *Zeitgebers*. Los modelos experimentales que se usan

para su estudio incluyen animales de laboratorio mantenidos en ciclos controlados de luz y oscuridad, ratones “knockout” para alguna de las proteínas responsables de la regulación del ciclo circadiano y, cultivos de células *in vitro*, que han sido sincronizadas en ciclo circadiano mediante altas concentraciones de suero (“serum shock”).

Desde la década de los 70’s se observó que la respuesta inmune depende de la hora del día en la cual ésta se analiza, y que la susceptibilidad a las infecciones depende también de la hora en la cual el organismo es infectado.

Por otro lado, se ha establecido una relación entre el metabolismo y el ciclo circadiano y entre el metabolismo y la respuesta inmune.

Sólo muy recientemente se ha empezado a establecer una relación entre el ciclo circadiano, el metabolismo celular y la respuesta inmune. Este trabajo presenta algunas evidencias sobre la comunicación entre estos tres niveles y propone algunas preguntas para investigaciones futuras.

Palabras clave: Ritmo circadiano, relojes moleculares, inmunidad, infección, PRRs, PAMPs

Abstract

The rotation movement of our planet has conditioned the development of cyclic patterns in most living organisms that repeat themselves approximately every 24 hours and are dependent on the natural cycles of light and darkness. This cyclic behavior was dubbed “circadian cycle” or “circadian rhythm”, from the Latin *circa*, “close to”, and *diem*, “day”. Circadian rhythms have been studied since the 60’s, when Franz Halberg used this term for the first time. Several genes, proteins, and protein-protein interactions that regulate circadian rhythms, as well as several of their inducers or *Zeitgebers* are currently well known. The experimental models in use include animals kept under controlled cycles of light and darkness, knockout mice for some of the proteins responsible for circadian rhythm control, and *in vitro* cultured cells that have previously been synchronized in their circadian rhythmicity by high concentrations of serum (serum shock).

Since the 70's it was observed that the immune response is dependent on the time at which it is analyzed and that the susceptibility to infection depends on the time of the day at which the organism is infected.

On the other hand, the relationship between metabolism and circadian rhythmicity, and between metabolism and immune response has been well established. Only recently, a crosstalk between circadian rhythmicity, cell metabolism, and immune response has beginning to emerge. This work highlights some recent evidence on the crosstalk between these three physiological levels and proposes some questions for future research avenues.

Keywords: Circadian rhythm, molecular clocks, immunity, infection, PRRs, PAMPs

Ritmo Circadiano

El movimiento rotatorio de nuestro planeta, implica cambios cíclicos en los periodos de luz y oscuridad, así como variaciones en la temperatura ambiental. Los seres vivos han tenido que adaptarse a estos cambios y, a lo largo de la evolución, han desarrollado un "reloj interno", cuya periodicidad es cercana a 24 horas. De aquí el término "Ritmo Circadiano", que proviene del Latín *circa* que significa cercano a y *diem* que significa día. Los ritmos biológicos más estudiados tienen periodos de aproximadamente 24h. Sin embargo, algunos ritmos biológicos son menores o mayores de 24h, tales como los procesos de eclosión de pupa a mosca en insectos, la liberación de estrógeno y progesterona en mamíferos [1, 2].

El ciclo circadiano le permite a un organismo regular su fisiología acorde con la hora del día, como la temperatura corporal, los periodos de sueño y vigilia, la liberación de hormonas y otros mediadores solubles [3]. A manera de ejemplo, los niveles de cortisol son mayores durante la mañana que durante la noche, y este patrón se repite invariablemente cada 24 horas, hasta la muerte. Los ritmos circadianos se ha conservado evolutivamente desde los organismos unicelulares, esto incluye a las diversas proteínas involucradas en regular el ritmo circadiano [4].

En los mamíferos, el hipotálamo posee un grupo de neuronas especializadas en la regulación el ritmo circadiano central, en una región anatómica denominada núcleo supraquiasmático (SCN) que funciona como un reloj biológico. Se ha demostrado que la eliminación del SCN causa arritmia conductual, que se manifiesta como trastornos alimenticios y del sueño, entre

otros [5]. Así mismo, el trasplante de SCN fetal en hámsteres cuyo SCN fue previamente lesionado, restablece la conducta circadiana [6]. Estudios posteriores demostraron que el SCN del hámster donador determina los patrones conductuales del hámster receptor [7]. A partir de estos trabajos se concluye que las neuronas del SCN forman un marcapasos o “*pacemaker*” de todo el organismo, con capacidad para controlar los ciclos de sueño y vigilia, de hambre y saciedad, la termorregulación, y la liberación de corticosteroides [7]. A su vez, el SCN es susceptible a diversos estimuladores extrínsecos, denominados en conjunto como “*Zeitgebers*”, del alemán generadores de tiempo. El *Zeitgeber* más común es la Luz, que determina los patrones fisiológicos asociados al día y a la noche.

Sin embargo, el ritmo circadiano responde también a inductores internos, lo que permite que algunas funciones biológicas mantengan un comportamiento cíclico aún en ausencia de un *Zeitgeber* extrínseco. A este proceso se le denomina “*free-running*” y se describió por primera vez al observar que un grupo de ratones de experimentación no perdieron su ritmo de sueño-vigilia, al ser mantenidos en ausencia de ciclos definidos de luz-obscuridad o bien, cuando fueron sometidos a periodos prolongados de obscuridad. Actualmente se sabe que esto ocurre debido a la existencia de *Zeitgebers* intrínsecos, que participan en el mantenimiento del ritmo circadiano.

Fisiología del ritmo circadiano central

En los mamíferos, los estímulos luminosos son recibidos por el ojo y transmitidos al SCN a través del tracto retino hipotalámico. Esto es posible porque la retina tiene una capa interna nuclear compuesta por células ganglionares que contienen un fotorpigmento llamado melanopsina, el cual actúa sobre el SCN [8, 9, 10]. La ausencia de melanopsina, sin embargo, no elimina por completo el comportamiento circadiano [4, 11]. Para la estimulación luminosa se requiere también de la participación de células denominadas conos y bastones, que producen otros fotorpigmentos de la familia de las opsinas [12, 13]. En conjunto, estas células transforman el estímulo de la luz en impulsos químicos (fotorpigmentos) que activan a las neuronas del SCN. Posteriormente, se activan proteínas con función de osciladores, involucradas directamente en marcar los ritmos y periodos; estas proteínas pertenecen a la familia CLOCK (“*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*”). Las proteínas con función de osciladores tienen una localización intracelular, un grupo de ellas regula positivamente (osciladores

positivos) y otro grupo regula negativamente (osciladores negativos) los ritmos circadianos [4, 14].

Algunas de las proteínas que se han descrito como osciladores positivos son: *CLOCK*, *BMAL1* (*Brain and Muscle ARNT-like protein 1*) y *ROR α* (*RAR-related Orphan Receptor gene alpha*). Algunos de los osciladores negativos son *Per1* y *Per2* (*Period homologous 1, 2*), *CRY1* y *CRY2* (*Cryptochrome 1, 2*), y *REV-ERB α* (*Nuclear Orphan Receptor alpha*). Los osciladores positivos regulan a los negativos y viceversa, mediante el tiempo de activación y la concentración de cada uno de ellos [14, 15].

La señalización se lleva a cabo de la siguiente manera: la síntesis de *BMAL1* se favorece por la unión de *ROR α* al sitio promotor y regiones “enhancer” del gen *Bmal1*, esta síntesis puede inhibirse por la acción de *REV-ERB α* ya que esta proteína compite por los mismos sitios de unión al DNA que *ROR α* .

Los osciladores positivos *CLOCK* y *BMAL1*, son factores de transcripción que al formar el heterodímero *CLOCK: BMAL1* favorecen la transcripción de *ROR α* , *REV-ERB α* , *Per1*, *Per2*, *CRY1* y *CRY2*. Por su parte, los osciladores negativos *Per* y *CRY* también forman heterodímeros, los cuales, una vez formados, se unen a proteínas como la isoforma 1 de la casein cinasa (*CK1 δ* y *CK1 ϵ*) [16], el factor *NONO* y la proteína con unidades de repetición de triptófano (W) y ácido aspártico (D) llamada *WDR5* [17], formando un complejo que se asocia al heterodímero *CLOCK: BMAL1*, impidiendo así la unión a sus sitios promotores. De esta forma, se establece una especie de “circuito cerrado” en el que las proteínas con función de osciladores son autorreguladas. Cabe mencionar que las proteínas *Per1* y *Per2* así como *CRY1* y *CRY2* tienen función redundante, ya que ambas isoformas participan indistintamente en la regulación del ritmo circadiano.

Ritmo Circadiano Periférico

Las proteínas osciladoras fueron descritas inicialmente como constituyentes de las neuronas del SCN. Sin embargo, hoy se sabe que éstas se expresan también en diversas células del hígado, en tejido endócrino, corazón, músculo esquelético y células del sistema inmune, regulando el ritmo circadiano periférico. Estos relojes periféricos están retrasados respecto al central [18, 19, 20]. Se ha observado que los relojes periféricos pueden tener un retraso de entre 7 y 11 horas con respecto al reloj central, dependiendo del órgano [21]. Los relojes

periféricos pueden fácilmente perder su sincronía en ausencia de las señales procedentes del SCN y varían entre individuos [20]. El ritmo circadiano periférico tiene como función brindar periodicidad a los procesos específicos de los órganos, tales como funciones metabólicas, y sus inductores o *Zeitgebers* pueden ser la ingesta alimenticia [22, 23], o la liberación de hormonas como los glucocorticoides [24].

Algunos ejemplos del control que ejerce el metabolismo sobre los ritmos circadianos periféricos son, la liberación de adiponectina en tejido subcutáneo y visceral graso, donde los niveles son mayores durante la mañana que durante la noche [25]; la detoxificación xenobiótica en el hígado, cuya actividad es mayor durante la noche debido a que las enzimas encargadas se activan a través de REV-ERB α [26]; o la lipogénesis, en la que se requiere de tioesterasaacil coenzima A, cuya transcripción es dependiente también de REV-ERB α y sus niveles tienen comportamiento circadiano [26, 27].

Metabolismo celular y respuesta inmune

Para que una célula lleve a cabo sus funciones de activación, secreción de citocinas, quimiotaxis, endocitosis, actividad microbicida y otras, requiere de energía proveniente del metabolismo celular. El metabolismo energético se fundamenta en la síntesis de ATP, a partir de la degradación de sustratos como lípidos (lipólisis) o carbohidratos (glicólisis). Esta última vía, en conjunción con la fosforilación oxidativa genera entre 30 y 32 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa [28, 29, 30].

La acumulación de energía en forma de ATP se lleva a cabo en la mitocondria, este organelo está formado por una membrana externa y una membrana interna, un espacio intermembranal y un espacio interno denominado matriz mitocondrial. La membrana externa posee proteínas que forman poros que permiten el paso de iones y moléculas hacia el espacio intermembranal. Por su parte, la membrana interna tiene una permeabilidad restringida y contiene proteínas encargadas de la síntesis y del transporte del ATP. El ciclo de Krebs se lleva a cabo en la matriz mitocondrial, a partir del cual se producen los electrones que llegan hasta su aceptor final que es el oxígeno. Este proceso, denominado fosforilación oxidativa, genera ATP [28, 29, 30].

La actividad metabólica y otras funciones mitocondriales dependen en gran medida de su morfología. Actualmente se sabe que las mitocondrias pueden

encontrase en forma de red, lo que corresponde a un proceso de fusión mitocondrial, o en forma fragmentada, lo que resulta de un proceso de fisión mitocondrial. Los procesos de fusión y fisión mitocondrial están mediados por proteínas específicas de la familia de las GTPasas. En la fusión mitocondrial participan las proteínas *Mitofusin 1* y *2* (Mfn1, 2) y *mitochondrial protein causing autosomal dominant Optic Atrophy (Opa-1)*. Por su parte, en la fisión mitocondrial participa la proteína *Dynamin-related protein-1* (Drp-1) [31, 32, 33, 34].

Se ha demostrado que cuando las mitocondrias se encuentran formando redes (mitocondrias fusionadas) hay un incremento en la síntesis de ATP y en la glicólisis, lo que correlaciona con una mayor actividad celular; en cambio, un su forma fragmentada (mitocondrias fisionadas) la energía se focaliza en sitios específicos de la célula, lo que se relaciona con bajos niveles globales de ATP y con la disminución del potencial de membrana mitocondrial (ΔV_m), en comparación con las mitocondrias fusionadas [30, 35, 36, 37].

El papel de las mitocondrias en los mecanismos efectores de la inmunidad ha sido estudiado en diferentes modelos. Se sabe, por ejemplo que las mitocondrias de los linfocitos T se dirigen a la sinapsis inmunológica, en un modelo experimental que simula la presentación de antígeno. Las mitocondrias en la sinapsis inmunológica captan y almacenan parte de calcio que está entrando a la célula como consecuencia de la activación de los linfocitos T y, cuando los niveles de calcio citoplásmico disminuyen, el calcio mitocondrial es liberado, lo que contribuye al mantenimiento, por un tiempo más prolongado de altas concentraciones de calcio, lo que a su vez permite que el factor de transcripción NF-AT permanezca activado (la activación del factor NF-AT depende de la actividad de una fosfatasa dependiente de calcio) [38].

Durante la interacción entre una célula tumoral y una célula asesina natural (NK), las mitocondrias de ambas células se distribuyen hacia el sitio de contacto célula-célula, lo que posiblemente contribuye al aporte regional del ATP necesario para la función citotóxica de la célula NK y como un mecanismo de protección para la célula tumoral [39], y un fenómeno similar ocurre en células presentadoras de antígeno [40].

El potencial de membrana mitocondrial así como la dinámica mitocondrial se modifican durante un proceso infeccioso, lo cual depende de la virulencia de la cepa infectante. Esto, a su vez, determina el desarrollo de la infección, como se ha observado durante la infección de macrófagos con *M. tuberculosis* y *L. monocytogenes* [41, 42, 43].

El estudio del papel de las mitocondrias en el proceso inflamatorio es un campo de intensa investigación y en el que se están haciendo grandes progresos [44].

Por otro lado, desde hace más de 10 años se sabe que los linfocitos T que se encuentran en proliferación son altamente glicolíticos, aún en presencia de oxígeno. En un proceso que semeja lo que ocurre con las células tumorales (efecto Warburg) [45]. Sin embargo, recientemente se ha observado que la activación de los linfocitos T es dependiente de la actividad de las mitocondrias, a partir de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno que a su vez, participan en procesos de señalización intracelular [46].

Metabolismo celular y ritmo circadiano

Los mecanismos que participan en la comunicación entre el metabolismo celular y el ritmo circadiano empiezan apenas a ser entendidos [47, 48]. Modelos animales en los que alguna de las proteínas con actividad de osciladores están ausentes, han mostrado que además de trastornos en el ciclo celular, se producen alteraciones metabólicas. Por ejemplo, los ratones BMAL-1 KO, desarrollan hipoglicemia, y lo mismo ocurre en ratones a los que se les ha bloqueado el dímero CLOCK-BMAL-1. La expresión de un número considerable de enzimas, transportadores de ATP, factores nucleares como PPAR α , que participan en diversas vías metabólicas, siguen un patrón circadiano, de tal forma que algunos procesos celulares como la detoxificación, varían a lo largo del día. Tal es el caso del dinucleótido de nicotinamina y adenina (NAD⁺), cuya biosíntesis está modulada por el ritmo circadiano. Así, la respiración mitocondrial y la producción de ATP están moduladas cíclicamente, mediante la acetilación y la oxidación del NAD⁺ [49].

Alteraciones en el metabolismo tienen un efecto sobre el ciclo circadiano y viceversa, estas alteraciones afectan la salud de los individuos afectados. Por ejemplo, los ratones que tienen una mutación en el gen que codifica para la hormona leptina, presentan alteraciones en sus patrones de sueño, letargia diurna y alteraciones en sus patrones alimenticios y, las mutaciones en los genes *clock* y *bmal1* están asociadas con fenotipos metabólicos de obesidad, hipertensión y diabetes tipo 2, entre otros [20, 27, 50]. Así mismo, el metabolismo de los lípidos es dependiente de REV-ERB α , y los ratones mutantes de este oscilador desarrollan síndrome metabólico. En el caso de los humanos, se ha observado que cuando éstos tienen cambios frecuentes en sus horarios de trabajo o cuando

están continuamente expuestos a cambios horarios por viajes a diferentes zonas horarias (*jet-lag* crónico) también desarrollan alteraciones metabólicas asociadas a desordenes en sus patrones de sueño [51, 52]. Además, en las células β pancreáticas, la deficiencia de BMAL-1 altera la secreción de insulina [53].

Respuesta Inmune

El sistema inmunológico está conformado por células y mediadores solubles con funciones específicas que le permiten discernir entre lo que es propio y lo que es extraño al organismo. Una de las consecuencias de este reconocimiento diferencial es la defensa del organismo frente a microorganismos patógenos. El sistema inmune se puede dividir para su estudio en sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. Sin embargo, estas dos ramas actúan en conjunto y constituyen un eficiente sistema de protección y homeostasis. El sistema innato es la primera línea de defensa, y lo constituyen proteínas del complemento, neutrófilos, células asesinas naturales (NK), células cebadas, monocitos y macrófagos. Estas últimas son células especializadas en la eliminación de agentes patógenos, células muertas y restos celulares, a través de la fagocitosis, estallido respiratorio, y activación de la respuesta inflamatoria, mediante la liberación de factores quimiotácticos, citocinas pro- y anti-inflamatorias. Esta respuesta también participa en la remodelación del tejido [54].

El sistema inmune adaptativo está compuesto por linfocitos T, Linfocitos B, y los mediadores solubles que estas células producen después de su activación, proliferación y diferenciación.

De acuerdo con su distribución anatómica, los macrófagos se clasifican en osteoclastos, alveolares, histiocitos, células de Kupffer y células de la microglía [55]. Con base en su perfil de citocinas y tipo de estímulo que inicia su activación, se distinguen 2 tipos de macrófagos; los activados clásicamente o M1, que producen citocinas proinflamatorias, mientras que los macrófagos M2, son activados alternativamente a través de IL-4 e IL-13; se considera que esta clase de macrófagos están implicados en la remodelación de los tejidos y en el mantenimiento de la homeostasis [56, 57, 58].

Se sabe que la presencia de BMAL favorece la respuesta inflamatoria. Esto se describirá con mayor detalle en la siguiente sección.

Ritmo circadiano y respuesta inmune

Estudios recientes han demostrado que hay un estrecho vínculo entre el ciclo circadiano y la respuesta inmune (o inflamación). La deficiencia de CRY en fibroblastos y monocitos derivados de médula ósea, aumenta la respuesta inflamatoria, mediante el aumento en la secreción de citocinas [59, 60]. En ratones sometidos a choque endotóxico por la administración de lipopolisacárido (LPS), la mortalidad depende de la hora del día en la que se administra el LPS, es decir, es dependiente del ciclo circadiano [61,62]. De igual forma, en macrófagos estimulados con LPS, la síntesis de citocinas como TNF- α e IL-6, sigue un patrón circadiano [62]. Por su parte, las células asesinas naturales o NK sintetizan Granzima B, perforina, IFN- γ y TNF- α , siguiendo un patrón circadiano [63].

El tracto intestinal está colonizado por aproximadamente 10^{12} bacterias, notablemente de los ordenes *Bacteroidetes* y, *Firmicutes*. Estas bacterias comensales cumplen funciones importantes como la degradación de algunos alimentos, lo que favorece su correcta absorción, además de impedir, por competencia, la colonización de otras bacterias potencialmente patogénicas. Se ha propuesto que el sistema inmune por un lado “tolera su presencia” y por otro, mantiene su crecimiento dentro de límites fisiológicos [64]. Una de las formas por las cuales el sistema inmune reconoce a las bacterias está mediada por receptores celulares llamados genéricamente “receptores de reconocimiento de patrones” o PRRs, entre los que se encuentran los “Toll-like receptors” o TLRs [65, 66], los cuales reconocen estructuras moleculares evolutivamente conservadas en los microorganismos, conocidas genéricamente como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) [67]. Recientemente, se ha demostrado que las células epiteliales del intestino expresan TLR-2 y TLR-4siguiendo un patrón circadiano, por lo que la señalización a través de estos TLRs por los PAMPs de las bacterias comensales solo ocurre durante una limitada ventana de tiempo [68].

La expresión de TLR-9 también sigue un comportamiento circadiano y, en un modelo de vacunación dependiente de TLR-9 se demostró que cuando los ratones son inmunizados al tiempo de máxima expresión de TLR-9 exhiben, semanas después una respuesta inmune protectora. Por otro lado, en un modelo de sepsis, dependiente de TLR-9 se demostró que la severidad de la sepsis depende del momento de su inducción [69]. Esto, desde luego, tiene un impacto directo en los programas de vacunación, así como en el tratamiento de la sepsis.

Ritmo circadiano, metabolismo celular y respuesta inmune

No obstante el rápido desarrollo experimental que ofrece nuevas y variadas evidencias de la relación entre ritmo circadiano y metabolismo y entre ritmo circadiano y respuesta inmune, la relación entre ritmo circadiano, metabolismo celular y respuesta inmune como un todo, está todavía poco explorada. Sin embargo, empieza a ser evidente que “dada la intensa demanda energética que se requiere para montar una respuesta inmune, un reloj biológico debe permitir al organismo utilizar la energía en los diferentes tejidos en forma diferencial a lo largo de los periodos de descanso y de los periodos de actividad” [70].

Recientemente, nuestro grupo de investigación, trabajando con un modelo *in vitro* de sincronización en ciclo circadiano de macrófagos peritoneales de ratón, encontró un nexo entre estos 3 sistemas, mostrando que la actividad mitocondrial y la actividad bactericida siguen un comportamiento circadiano que correlaciona con la expresión de Per2. La dinámica mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial, como indicadores de su actividad metabólica, están también relacionados con la actividad bactericida y endocítica de los macrófagos. Estos resultados muestran interdependencia entre los 3 niveles de actividad biológica [71].

Perspectivas

Desde una perspectiva puramente aplicativa, es necesario contar con bases científicas que permitan establecer las condiciones óptimas de vacunación, incluida la hora del día en que las vacunas deben ser aplicadas. La importancia de la vía de administración de los antígenos ha sido reconocida desde hace mucho tiempo [72, 73], sin embargo, no se ha tomado en cuenta si la composición celular de los tejidos cambia en forma circadiana y si esto pudiera incidir en la efectividad de una vacuna. También, sugerimos que el estudio de enfermedades como diabetes, síndrome metabólico, obesidad y otras, debe orientarse a la búsqueda de estrategias de tratamiento que tomen en cuenta los ritmos circadianos. Estamos seguros de que habrá grandes progresos en este campo, antes del próximo taller de actualización bioquímica.

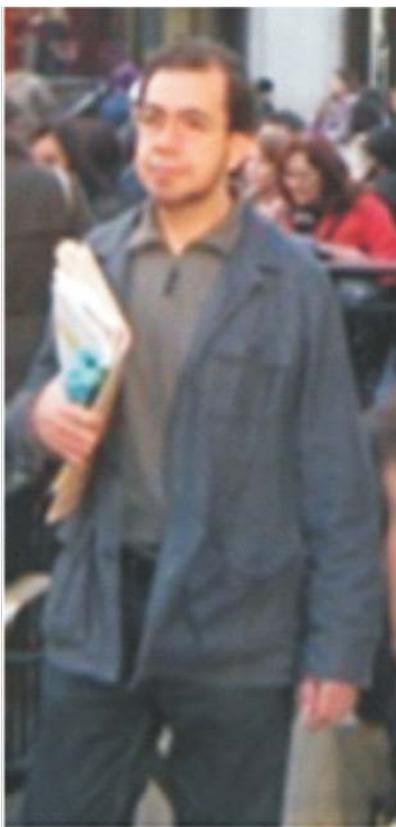
Referencias

1. Pittendrigh, C.S. (1960) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. **25**, 159-184
2. Dunlap, J.C. (1999) Cell. **96**, 271-290
3. Lam, C.K., Chari, M. y Lam, T.K. (2009) Physiology. **24**, 159-170
4. Panda, S., Hogenesch, J.B. y Kay, S.A. (2002) Nature. **417**, 329-335
5. Stephan, F.K. y Zucker, I. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **69**, 1583-1586
6. Lehman, M., Silver, R., Glasstone, W., Kahan, R., Gibson, M. y Bittman, E. (1987) J. Neuroscience. **7**, 1626-1638
7. Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C. y Menaker, M. (1990) Science. **247**, 975-978
8. Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P. y Rollag, M.D. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**, 340-345
9. Berson, D.M., Dunn, F.A. y Takao, M. (2002) Science. **295**, 1070-1073
10. Hattar, S., Liao, H., Takao, M., Berson, D.M. y Yau, K. (2002) Science. **295**, 1065-1070
11. Ruby, N.F., Brennan, T.J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H.C. y O'Hara, B.F. (2002) Science. **298**, 2211-2213
12. Hattar, S., Lucas, R.J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R.H., Hankins, M.W., Lem, J., Biel, M., Hofmann, F. y Foster, R.G. (2003). Nature. **424**, 75-81
13. Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T. Y. y Andahazy, M. (2003) Science. **301**, 525-527
14. Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L. y Zoran, M.J. (2005) Nat. Rev. Genet. **6**, 544-556
15. Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R. y Reppert, S.M. (1998) Neuron. **20**, 1103-1110.
16. Lee, H., Chen, R., Lee, Y., Yoo, S. y Lee, C. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **106**, 21359-21364
17. Brown, S. A., Ripperger, J., Kadener, S., Fleury-Olela, F., Vilbois, F., Rosbash, M. y Schibler, U. (2005b). Science. **308**, 693-696
18. Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J.S. y Schibler, U. (2007) PLoS Biol. **5**, e34
19. Lamia, K.A., Storch, K.F. y Weitz, C.J. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. **105**, 15172-15177
20. Yoo, S., Yamasaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buht, E.D., Siepkka, S.M., Hong, H., Oh, W.J. y Yoo, O.J. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. **101**, 5339-5346.
21. Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Blocks, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M. y Tei, H. (2000) Science. **288**, 687-685
22. Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F. y Schibler, U. (2000) Genes & Development. **14**, 2950-2961
23. Stokkan, K., Yamasaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. y Menaker, M. (2001) Science. **291**, 490-493.

24. Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schutz, G. y Schibler, U. (2000) *Science*. **289**, 2344-2347
25. Gómez-Abellán, P., Gómez-Santos, C., Madrid, J.A., Milagro, F.L., Campion, J., Martínez, J.A., Ordivás, J.M. y Garaulet, M. (2010) *Endocrinology*. **151(1)**, 115-122
26. Gachon, F., Leuenberger, N., Claudel, T., Gos, P., Jouffe, C., Fleury, Olela, F., de Mollerat du Jeu, X., Wahli, W. y Schibler, U. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 4794-9
27. Le Martelot, G., Claudel, T., Gattfield, D., Schaad, O., Kornmann, B., Sasso, G.L., Moschetta, A. y Schibler, U. (2009) *PLoS Biol*. **7**, e1000181
28. Melkikh, A.V. y Seleznev, V.D. (2012) *Prog. Biophys. Mol. Biol*. **109**, 33-57
29. Muller, M., Mentel, M., van Hellemond, J.J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S.B., Yu, R.Y., van der Giezen, M., Tielens, A.G. y Martin, W.F. (2012) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 444-495
30. Youle, R.J. y van der Bliek, A.M. (2012) *Science*. **337**, 1062-1065
31. Bereiter-Hahn, J. y Voth, M. (1994) *Microsc. Res. Tech.* **27**, 198-219
32. Griparic, L., Kanazawa, T. y van der Bliek, A.M. (2007) *J. Cell. Biol.* **178**, 757-764
33. Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. y Mihara, K. (2006) *EMBO*. **25**, 2966-2977
34. Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M. y Nunnari, J. (2006) *Cell*. **127**, 383-395
35. Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. y Sheng, M. (2004) *Cell*. **119**, 873-887
36. Otera, H. y Mihara, K. (2011) *J. Biochem.* **149**, 241-251
37. Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstro, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S. y Las, G. (2008) *EMBO*. **27**, 433-446
38. Quintana, A., Schwindling, C., Wenning, A.S., Becherer, U., Rettig, J., Schwarz, E.C. y Hoth, M. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**, 14418-14423
39. Abarca-Rojano, E., Muñoz-Hernández, S., Moreno-Altamirano, M.M., Mondragón-Flores, R., Enriquez-Rincón, F. y Sánchez-García, F.J. (2009) *Immunol. Lett.* **122**, 18-25
40. Bonifaz, L.C., Cervantes-Silva, M.P., Ontiveros-Dotor, E., López-Villegas, E.O. y Sánchez-García, F.J. (enviado).
41. Abarca-Rojano, E., Rosas-Medina, P., Zamudio-Cortez, P., Mondragón-Flores, R. y Sánchez-García, F.J. (2003) *Scan. J. Immunol.* **58**, 419-427
42. Stavru, F., Bouillaud, F., Sartori, A., Ricquier, D. y Cossart, P. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 3612-3617
43. Stavru, F., Palmer, A.E., Wang, C., Youle, R.J. y Cossart, P. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 16003-16008
44. Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Lee, H., Zou, J., Saitoh, T. y Akira, S. (2013) *Nature Immunol.* **14**, 454-460
45. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. y Thompson C.B. (2009). *Science* **324**, 1029-1033
46. Sena, L.A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D.A., Wang, C.R., Schumacker, P.T., Licht, J.D., Perlman, H., Bryce, P.J. y Chandel, N.S. (2013) *Immunity* **38**, 225-236.

47. Yang, X., Downes, M., Yu, R.T., Bookout, A.L., He, W., Straume, M., Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M. (2006) *Cell*.**126**, 801-810
48. Zhang, E. E., Liu, Y., Dentin, R., Pongsawakul, P. Y., Liu, A. C., Hirota, T., Nusinow, D. A., Sun, X., Landais, S. y Kodama, Y. (2010) *Nat.Med*.**16**, 1152-1156
49. Peek, C.B., Affinati, A.H., Ramsey, K.M., Kuo, H.Y., Yu, W., Sena, L.A., Ilkayeva, O., Marcheiva, B., Kobayashi, Y., Omura, C., Levine, D.C., Bacsik, D.J., Gius, D., Newgard, C.B., Goetzman, E., Chandel, N.S., Denu, J.M., Mrksich, M. y Bass, J. (2013) *Science*. **342**(6158),1243417
50. Bugge, A., Feng, D., Everett, L.J., Briggs, E.R., Mullican, S.E., Wang, F., Jager, J. y Lazar, M.A. (2012) *Genes Dev*. **26**, 657-667
51. Li, M.D., Li, C.M. y Wang, Z. (2012) *Yale J. Biol. Med*.**85**,387-401
52. Wang, X.S., Armstrong, M.E., Cairns, B.J., Key, T.J. y Travis, R.C. (2011) *Occup. Med. Lond*. **61**(2),78-89
53. Lee, J., Maulik, M., Fang, Z., Saha, P., Zou, F., Xu, Y., Nelson, D.L., Ma, L., Moore, D.D. y Yechool, V.K. (2013) *Mol Cell Biol*.**33**(11), 2327-38
54. Robbins, C. S. y Swirski, F.K. (2010) *Cell. Mol. Life Sci*.**67**, 2685-2693
55. Davies, L.C., Rosas, M., Smith, P. J., Fraser, D. J., Jones, S. A. y Taylor, P. R. (2011) *Eur. J. Immunol*.**41**(8), 2155-64
56. Rodríguez-Prados, J.C., Través, P. G., Cuenca, J., Rico, D., Argonés, J., Martín-Sanz, P., Cascante, M. y Boscá, L. (2010) *J. Immunol*.**185**, 605-614
57. Mosser, D. M. y Edwards, J. P. (2008) *Nat. Rev. Immunol*.**8**, 958-969
58. Anderson, C. F. y Mosser, D. M. (2002) *J. Leukocyte Biol*.**72**, 101-106
59. Marcheiva, B., Ramsey, K.M., Buhr, E.D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C.H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S. y Vitaterna, M.H. (2010) *Nature*.**466**, 627-631
60. Narasimamurthy, R., Hatori, M., Nayak, S.K., Liu, F., Panda, S. y Verma, I.M. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.**109**,12662-12667
61. Hayashi, M., Shimba, S. y Tezuka, M. (2007) *Biol. Pharm. Bull*.**30**(4), 621–626
62. Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G.D., Herzog, E.D., Volk, H.D., Kramer, A. y Maier, B. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.**106**, 21407-21412
63. Arjona, A. y Sarkar, D.K. (2005) *J. Immunol*. **174**, 7618-7624
64. Spor, A., Omry, K. y Ley, R. (2011) *Nat Rev Microbiol*. **9**, 279-290
65. Kawai, T. y Akira, S. (2006) *Cell Death Differ*.**13**(5), 816-25
66. Medzhitov, R. (2007) *Nature*. **449**, 819-826
67. Sansonetti, P. J. (2006) *Nature Immunology*.**7**(12), 1237-1242
68. Magalhaes, J.G., Tattoli, I. y Girardin, S. E. (2007) *Semin. Immunol*.**19**, 106-115
69. Silver, A.C., Arjona, A., Walker, W.E. y Fikrig E. (2012). *Immunity***36**: 251-261.
70. Curtis, A.M., Belet, M.M., Saassone-Corsi, P. y O'Neill, L.A.J. (2014). *Immunity*. **40**, 178-186
71. Oliva-Ramírez, J.,Moreno-Altamirano, M.M.B., Pineda-Olvera, B; Cauich-Sánchez, P. y Sánchez-García, F.J. (enviado)
72. Karabay, O., Temel, A., Koker, A.G., Toker, M., Ceyhan, M. y Kocoglu, E. (2008) *Vaccine*. **26**(9), 1143-4
73. Tsai, T.H., Burns, R.E. y Scheving, L.E. (1979) *Chronobiology*.**6**(3), 187-201

Semblanza del Dr. Francisco Javier Sánchez García



Cursó la carrera de Químico Bacteriólogo y Parasitólogo en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (1978-1983), así como la Maestría y el Doctorado en Ciencias en Inmunología, en la misma institución (1983-1989), siendo su director de tesis doctoral el Dr. Luis Antonio Jiménez Zamudio. Realizó estancias de investigación en “University College London”, en el “National Institute for Medical Research”, ambas en Londres, Inglaterra y en “University of Florida College of Medicine”, en los Estados Unidos, trabajando con los profesores Nicholas Avrion Mitchison, Joseph M. Colston y Wayne T. McCormack, respectivamente. Recientemente fue profesor invitado en el Wolfson Institute for Biomedical Research-UCL, donde trabajó al lado del profesor Sir Salvador Moncada (Agosto 2010-Julio 2011).

Actualmente es profesor- investigador al programa de Posgrado en Inmunología de la ENCB-IPN, donde imparte la cátedra “Inmunobiología Avanzada”.

Es miembro del sistema Nacional de Investigadores (nivel II). Ha recibido algunas distinciones académicas entre las que destacan el primer lugar del Premio Nacional de Investigación Glaxo Smith Kline (2004) y el segundo lugar del Premio Canifarma (2013).

Los temas científicos que actualmente capturan su atención incluyen: la relación entre el metabolismo celular y diversos procesos inmunológicos como la diferenciación celular, la actividad bactericida, el procesamiento y presentación de antígeno; los mecanismos celulares que regulan la respuesta proliferativa de linfocitos T, y la comunicación entre los patógenos y su célula hospedera.