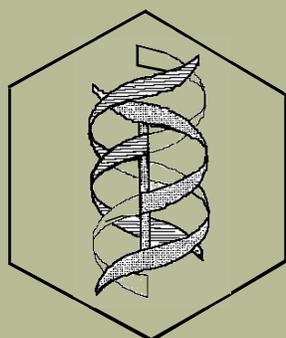


REB 2010

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la
**Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, A.C.**

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNAM



Facultad de Medicina
UNAM



Sociedad Mexicana de
Bioquímica, A.C.

EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

VOL. 29

No. 1

MARZO 2010

COMITÉ EDITORIAL

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

EDITORES

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

LEONOR FERNÁNDEZ RIVERA RÍO

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GRACIELA MEZA RUIZ

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL

Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

ASISTENTE EDITORIAL

MARIVEL ROJAS GARCÍA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES FUNDADORES

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

ENRIQUE PIÑA GARZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Coordinadora
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

JORGE LUIS RICO PÉREZ

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México

CARLOS CERVANTES VEGA

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

JOSÉ CARLOS GARCÍA PIÑEIRO

Facultad de Ciencias Básicas "Victoria de Girón"
Instituto Superior de Ciencias Médicas. La Habana, Cuba

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

MYRNA SABANERO LÓPEZ

Instituto de Investigación en Biología Experimental
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guanajuato

SERGIO SÁNCHEZ-ARMÁSS ACUÑA

Departamento de Fisiología y Farmacología
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

MARTHA ANGÉLICA QUINTANAR ESCORZA

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina Humana, Universidad Juárez del Estado de Durango

MARÍA MALDONADO VEGA

Departamento de Investigación. Centro de Innovación Aplicada en
Tecnologías Competitivas, AC. León, Gto., Mexico

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos Periódica, Iresie, Redalyc y Latindex.

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), publicación trimestral. La presentación y disposición en conjunto y de cada página de la Revista de Educación Bioquímica son propiedad del editor. Derechos reservados © Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Queda estrictamente prohibida la reproducción parcial o total por cualquier sistema o método mecánico o electrónico sin autorización por escrito del editor. Certificados de: Licitud de Título: 12000; Licitud de Contenido: 8397, expediente No. 1/432"2"/15792; Reserva al título en Derechos de Autor No. 04-2002-030616225500-102. (ISSN: 1665-1995); Reserva de título en Derechos de Autor para publicación electrónica No. 04-2005-092612014100-203 (ISSN: 187-3690). Diseño: Celia Virginia Sánchez Meza; UNAM-Departamento de Bioquímica y Facultad de Medicina. Distribución electrónica: Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), UNAM (<http://computo.sid.unam.mx/Bioquimica> o bien <http://www.puis.unam.mx>). Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C. P. 04510, México, D. F. Correo electrónico: reb@bq.unam.mx.

El contenido de los artículos y las opiniones expresadas en ellos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente las del Comité Editorial.

CONTENIDO

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

CINCO MUJERES ASALTAN ESTOCOLMO
Graciela Meza Ruiz.....1

ARTÍCULOS

BACTERIAS LÁCTICAS COMO TERAPIA
ALTERNATIVA PARA ENFERMEDADES INFLA-
MATORIAS INTESTINALES
Leny Judith Álvarez Araujo.....2

LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCO-
LINA Y LAS α -CONOTOXINAS
Estuardo López Vera.....8

CISTOGÉNESIS DE *TOXOPLASMA GONDII*
Norma Rivera Fernández y
Ricardo Mondragón Flores.....13

OTRAS COMUNICACIONES

CRUCIBIOQ
ENZIMAS: HIDROLASAS
Yolanda Saldaña Balmori.....19

EDWIN GERHARD KREBS
(1918-2009)
M Eugenia Torres-Márquez22

CONVOCATORIA A REUNIÓN DE
NEGOCIOS DE LA AMPB, A. C.23

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
ENZIMAS: HIDROLASAS
Yolanda Saldaña Balmori.....24

1ra. FERIA LATINOAMERICANA DE
INNOVACIÓN E INVENCIÓN EN SALUD.....25

INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DE LA REVISTA DE
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....26

EDITORIAL

CINCO MUJERES ASALTAN ESTOCOLMO

El pasado 10 de Diciembre del 2009 fueron reconocidos con el Premio Nobel 2009 seis destacados científicos, una literata y 2 economistas. De los 9 galardonados, cinco son mujeres (¡la mayoría!!!) caso insólito en este tipo de reconocimientos. Es de esperarse que esta situación se repita muy a menudo.

En el campo de la Medicina fueron premiados la australiana Elizabeth H. Blackburn, de la Universidad de California en San Francisco, la estadounidense Carol W. Greider de la Escuela de Medicina de la Universidad de Johns Hopkins y el británico Jack W. Szostak del Hospital General de Massachussets, descubridores de los telómeros, estructura más distal de los cromosomas y de la enzima encargada de restituir la longitud del telómero, la telomerasa. Estos investigadores describieron cómo los telómeros se acortan, cada vez que la célula se divide constituyendo un reloj biológico del tiempo vital de cada célula. Estos estudios no sólo son importantes para entender la sobrevivencia de las células cancerosas sino que aspiran a comprender el proceso del envejecimiento en células en constante división y su posible regulación.

La israelí Ada E. Yonath del Instituto Weizmann de Ciencias en Israel, el hindú Venkatraman Ramakrishnan, Profesor de Cambridge en la Gran Bretaña y el investigador Thomas Steiz del Instituto Howard Hughes de la Universidad de Yale, recibieron la presea en el campo de la Química por sus investigaciones sobre la relación estructura-función del ribosoma, organelo omnipresente en las células de los seres vivos, utilizando principalmente técnicas de cristalografía atómica y de rayos X, con lo cual lograron un entendimiento más profundo del proceso de síntesis de proteínas.

La alemana de origen rumano Hertha Müller fue premiada con el Nobel de Literatura 2009 por su descripción poética y realista del mundo de los desposeídos en la Rumanía tiranizada por Ceaucescu, así como sus crudos relatos de la vida de las minorías alemanas de Europa Central durante la Segunda Guerra Mundial.

Elinor Ostrom, profesora de la Universidad de Indiana, es la primera mujer en la historia del Premio Nobel en Economía en recibir tan importante galardón compartiéndolo con Oliver E. Williamson, investigador de la Universidad de California en Berkeley, por desarrollar el método de cómo los fondos y recursos públicos deben ser utilizados y controlados para favorecer la supervivencia de un Estado bajo el régimen económico de la Seguridad Social. (Se rumora que se les nombrará asesores vitalicios de los integrantes del Congreso Mexicano y de los titulares de Hacienda y del IMSS de nuestro país).

Me abstengo de comentar quien recibió el Premio Nobel de la Paz 2009, por considerar que es el más injusto y politizado de todos y hago votos porque algún día esta presea sea otorgada a otra mujer de la estatura de la Madre Teresa de Calcuta.

Dra. Graciela Meza Ruiz
División de Neurociencias
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

BACTERIAS LÁCTICAS COMO TERAPIA ALTERNATIVA PARA ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES*

Leny Judith Álvarez Araujo

RESUMEN

Dentro de las enfermedades inflamatorias intestinales se encuentran la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, las cuales presentan una alta incidencia a nivel mundial. En la actualidad no se cuenta con tratamientos eficaces para combatirlas debido al conocimiento parcial sobre su patogénesis, por lo que muchas de las terapias ocasionan efectos secundarios más graves que la misma enfermedad. Las bacterias lácticas son clasificadas como probióticos y se han utilizado como modelos de expresión de proteínas heterólogas. *Lactococcus lactis* es una de las más estudiadas debido a su alta capacidad para secretar proteínas heterólogas al medio en modelos murinos de las patologías mencionadas. Debido a la disponibilidad de este organismo, es posible su uso en el desarrollo de terapias que coadyuven a la inmunidad preventiva de las enfermedades inflamatorias intestinales.

PALABRAS CLAVE: *Lactococcus lactis*, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn.

ABSTRACT

Inside the classification of the Inflammatory bowel diseases we can find the ulcerative colitis and the Crohn's disease, both of them have a high worldwide incidence. Up today the treatments for these diseases are inefficient due to the lack of knowledge of its pathogenesis. Most of the therapies increase malaise to the patient. Lactic bacteria are classified as probiotics and they have been used as expression models for heterologous proteins. *Lactococcus lactis* is one of the most studied because of its high capacity to secrete heterologous proteins to the media; this gives it a great value to use it for developing therapeutic vaccines of easy administration.

KEY WORDS: *Lactococcus lactis*, ulcerative colitis, Crohn's disease.

INTRODUCCIÓN

La inflamación intestinal es una respuesta montada por el organismo humano en contra de cualquier agente infeccioso. El tipo de respuesta inflamatoria dependerá del tipo de antígeno. Así, una respuesta aguda, la cual es inducida por una bacteria común, involucra una respuesta inmediata por células polimorfonucleares; mientras que en una inflamación crónica de origen desconocido se involucran diferentes tipos celulares que interactúan de distintas formas para mantener la inflamación (1).

ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) generan una respuesta crónica y se dividen en 2 enfermedades importantes: la colitis ulcerativa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Ambas tienen una incidencia importante a nivel mundial, sólo en Estados Unidos se presentan 30,000 nuevos casos cada año y se estima que aproximadamente 1 millón de individuos presentan EII. Ambas enfermedades son diagnosticadas entre la adolescencia y cuarta década, tanto en hombres como en mujeres (2).

Aun no se sabe con certeza cuál es la patogénesis de estas enfermedades, se han realizado estudios con los cuales se llegó a la conclusión de que hay 3 factores que interactúan para desencadenar las EII. Primero, dentro de los factores ambientales se ha encontrado que el cigarro y la nicotina afectan tanto la inmunidad celular como la humoral y reducen la motilidad del colon; el uso de drogas antiinflamatorias no esteroideas puede inducir que aparezca de nuevo la enfermedad (3). Segundo, factores congénitos, pues recientemente se han descubierto mutaciones que están alta-

*Recibido: 10 de marzo de 2009 Aceptado: 13 de octubre de 2009

Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Cd. Juárez Chihuahua, México. Correo E: Judithal79@gmail.com

mente asociadas con estas enfermedades; un ejemplo claro es el gen NOD2/CARD15 (el cual se encuentra en el cromosoma 16) que produce una proteína citoplasmática en macrófagos y sirve como receptor de reconocimiento para lipopolisacáridos bacterianos (3). Tercero, desregulación inmunológica, la cual se refiere a una activación sostenida de la respuesta inmune de mucosa, provocada por bacterias comensales en el lumen o por la penetración de productos bacterianos a través de la barrera de mucosa y que interactúan directamente con células dendríticas y linfocitos (3).

SÍNTOMAS

Estas enfermedades presentan síntomas clínicos similares, a pesar de que son desórdenes diferentes, algunas de estas características en común son: fiebre, vómito y diarrea. La CU se caracteriza por estar confinada al colon, presenta una inflamación superficial (mucosa) con infiltración de

linfocitos y granulocitos y pérdida de las células que forman la estructura de las vellosidades intestinales; mientras que la EC puede aparecer en cualquier parte del tracto gastrointestinal, tiene una infiltración densa de linfocitos y macrófagos afectando todas las capas de la pared intestinal (2, 4).

TRATAMIENTOS

Debido a que aun no se conocen con certeza las causas de la EC y la CU, los tratamientos con los que se cuenta hasta el momento no son 100% efectivos, llevando a muchos pacientes, con el tiempo, a cirugías, debido a que el tratamiento médico deja de tener efecto o por complicaciones de la enfermedad. Algunos de los medicamentos usados para tratar las EII son los corticoesteroides, aminosalicilatos, agentes inmunomoduladores, antibióticos y otros agentes novedosos (Tabla 1) (5). El uso de estos tratamientos depende de varios factores, como por ejemplo: qué tan avanzada

se encuentre la enfermedad, cómo ha respondido el paciente a otros medicamentos, si hay alguna complicación y cuál sea la meta clínica que se desea obtener (mantenimiento o remisión). Como se puede observar no todas las terapias pueden ser usadas de la misma forma, además que la mayoría de ellas presentan efectos secundarios severos si son aplicadas por un periodo prolongado; esto lleva a la suspensión del tratamiento o la modificación del mismo, agravando aun más la condición del paciente (6).

Dentro de los agentes novedosos se encuentran las terapias biológicas, muchas de éstas diseñadas para bloquear la respuesta inflamatoria por medio de anticuerpos en contra de las proteínas involucradas en esta cascada: el infliximab, los anticuerpos monoclonales (mAb) contra interleucinas IL-12, IL-18; IL-10; anti-CD3, anti-CD25 y que son las que hasta la fecha se han estudiado más, mostrando resultados favorables para los pacientes. Algunas otras de estas

TABLA 1
Tratamientos médicos actuales para la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa

	ENFERMEDAD DE CROHN			COLITIS ULCERAIVA		
	Leve a moderada	Severa	Terapia de control	Leve a moderada	Severa	Terapia de control
5-ASA						
Oral	+	-	+	+	-	+
Tópica	+	-	+	+	-	+
Corticoesteroides						
Oral	+	+	-	+	+	-
Tópicos	+	+	-	+	+/-	-
Intravenoso (IV)	+	+	-	+	+	-
antibióticos	+	+/-	+/-	-	-	+/-
AZA/6-MP	+	+	+	+	+	+
Metotrexato	+	+/-	+/-	?	?	?
Ciclosporina	-	+/-	-	?	+	-
Infliximab	+	+	+	?	?	?

5-ASA (ácido 5-aminosalicilado), AZA (azatioprina), 6-MP (6-mercaptopurina). (+) Funcionable, (-) no funcionable, (?) se desconoce su funcionalidad.

terapias que están en proceso de investigación se basan en inhibidores de los factores de transcripción, inhibidores de las señales de transducción y en usar factores de crecimiento para estimular el sistema inmune innato (7).

Modelos experimentales en las enfermedades inflamatorias intestinales

Los modelos murinos de inflamación mucosal, debido a su amplia variedad, están dando pistas importantes para los varios mecanismos de las EII. Estos son modelos que pueden ser inducidos o que ocurren de manera espontánea, como es el caso de los ratones "knockout" en IL-10 y en IL-12 los cuales desarrollan inflamación colónica estando presentes en un ambiente normal. Los modelos inducidos se refieren a aquellos animales que han sido tratados con agentes que promueven la inflamación intestinal, como el dextrán sulfato de sodio (DSS) y el ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS). Estos agentes son capaces de dañar la mucosa intestinal y producir una respuesta inflamatoria capaz de tornarse crónica, simulando, de esta manera, a las EII en humanos. La colitis se induce mediante un enema que contenga TNBS en etanol o DSS. Este último agente es el modelo más frecuentemente utilizado para estudiar los mecanismos de reparación de mucosa. Una solución al 4% de esta sustancia causa síntomas similares a la colitis ulcerativa en 4 días; se ha observado que exposiciones por tiempo más largo resultan en perforaciones del intestino y muerte. Estudios previos han demostrado que el DSS es citotóxico sólo en el epitelio colonico induciendo daño y pérdida de criptas, erosiones masivas y una baja en el número de células de goblet (8).

TABLA 2

Crterios para la seleccin de microorganismos probi3ticos

Actividad no patogénica
Estables en ácidos y sales biliares
Adherencia en células intestinales humanas
Persistencia en el tracto intestinal humano
Producción de sustancias antimicrobianas
Antagonismo en contra de bacterias patógenas
Seguridad en uso clínico y alimenticio
Efectos en la salud clínicamente validados y documentados

BACTERIAS LÁCTICAS

Papel de los probi3ticos en las enfermedades inflamatorias intestinales

En trabajos recientes se ha encontrado que las bacterias probi3ticas son efectivas en el manejo ciertas enfermedades diarreicas agudas. El término probi3tico o pro-vida se introdujo en 1965 por Lilly y Stillwell, el cual significa organismos vivos que afectan de forma benéfica al huésped al mejorar el equilibrio microbiano intestinal. Pero antes de ellos, Elie Metchnikoff ya le había atribuido propiedades benélicas para el ser humano a ciertas bacterias como *Lactobacillus* que se encuentra presente en el yogurt (9). El mantenimiento de una microflora saludable puede prevenir trastornos gastrointestinales, incluyendo infección gastrointestinal, enfermedades inflamatorias intestinales e incluso cáncer. Las bacterias probi3ticas se sabe que son de uso mundial y se encuentran presentes en productos lácteos y jugos. Las bacterias que se encuentran dentro de este grupo son las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las cuales son las de mayor uso comercial. Aunque también se incluyen algunas otras como: *Streptococcus thermophilus*, levaduras (*Saccharomyces boulardii*) y mohos (9).

Los probi3ticos son microorganismos que no poseen patogenicidad, los cuales al ser ingeridos tienen efec-

tos benélicos en la salud de la persona, así como la capacidad de prevenir ciertas condiciones patológicas (10). Para que una bacteria pueda ser catalogada como probi3tica debe cumplir con ciertos requisitos y características específicas (Tabla 2) y principalmente contar con la categoría de GRAS (generalmente reconocidas como seguras). Entre algunos de los beneficios a la salud que se han atribuido a estos probi3ticos se encuentran que son capaces de mantener la microflora intestinal normal, son inmunoestimuladores e inmunomoduladores, tienen actividad anticarcinogénica y antimutagénica y reducen el colesterol en suero (11).

Para que un probi3tico pueda beneficiar a la salud humana debe cubrir ciertos requisitos:

- tener propiedades tecnológicas para que pueda manufacturarse e incorporarse a productos alimenticios, sin perder funcionalidad.
- no debe crear texturas o colores desagradables,
- debe sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal y arribar vivo al sitio de acción,
- debe funcionar en ambientes del intestino.

Aun no se determina con exactitud cuáles son los mecanismos de acción con los que actúan los probi3ticos para prevenir al huésped de enfermedades intestinales. Algunas

TABLA 3
Proteínas heterólogas producidas en *Lactococcus lactis*

Proteína	Origen	Localización	Referencia
L7/L12	<i>Brucilla abortus</i>	Citoplasma/secretada/anclada	Ribeiro et al 2002*
CWP2	<i>Giardia lamblia</i>	Intracelular/secretada/anclada	Lee y Faubert 2006
E7	HPV tipo 16	Citoplasma/secretada/anclaje	Bermúdez-Humarán et al 2002*
NSP4	Coronavirus de bovino	Citoplasma	Enouf et al 2001*
IL-12	Ratón	Secretada	Bermúdez-Humarán et al 2003*
BLG	Bovino	Citoplasma/secretada	Nouaille et al 2005*
EDIII	Virus del Dengue, serotipo 2	Citoplasma	Alonso et al 2008
TFF	Murino	Secretada	Vandenbroucke et al 2004

*citados en Le Loir et al 2005. Proteína de la pared del quiste (CWP); Proteína no estructural 4 (NSP4); β -Lactoglobulina bovina (BLG); Factor trefoil (TFF); Dominio III de la cubierta (EDIII).

propuestas que se manejan mencionan que involucran cambios en el pH, son capaces de competir por los nutrientes con bacterias patógenas; compiten por los sitios de unión a los receptores a los que se unen los patógenos; pueden regular la producción de citocinas pro y anti-inflamatorias; pueden producir sustancias, como ácidos orgánicos y bacteriocinas, que inhiben a otras bacterias y pueden estimular la secreción de IgA (10, 11).

Se ha mostrado que estos probióticos preservan la integridad del intestino y median el efecto de un número de otras enfermedades intestinales, como diarrea asociada a antibióticos; enfermedades inflamatorias intestinales; diarrea pediátrica; diarrea de viajero y colitis. Estudios han mostrado una mejoría en los síntomas de EII y CU con el consumo de ciertas cepas lácticas. Aun se están haciendo estudios para encontrar la mejor forma de aprovechar a estas bacterias para la mejoría en las enfermedades de inflamación intestinal.

USO DE BACTERIAS LÁCTICAS COMO TERAPIA

Las bacterias lácticas (BL) son bacterias gram positivas no invasivas y no patógenas clasificadas como GRAS.

Estas son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia así como en el consumo diario por los humanos. Debido a sus características son excelentes candidatas como vectores para la producción de proteínas en alimentos o en el tracto digestivo de humanos y animales. Las bacterias que más se emplean como vehículos son *Lactobacillus sp.* y *Lactococcus sp.* Esto a diferencia de los actuales vectores como lo son la *Salmonella*, *Myco-*

bacterium y *E. coli*, que no pueden ser clasificados como seguros a pesar de que han sido altamente modificados para disminuir su patogenicidad (12).

LACTOCOCCUS LACTIS COMO VEHÍCULO DE EXPRESIÓN

L. lactis es una bacteria gram positiva que mide entre 0.5 - 1.5 μ m de diámetro, es uno de los microorganismos más usados en la industria alimenticia debido a su capacidad de producir

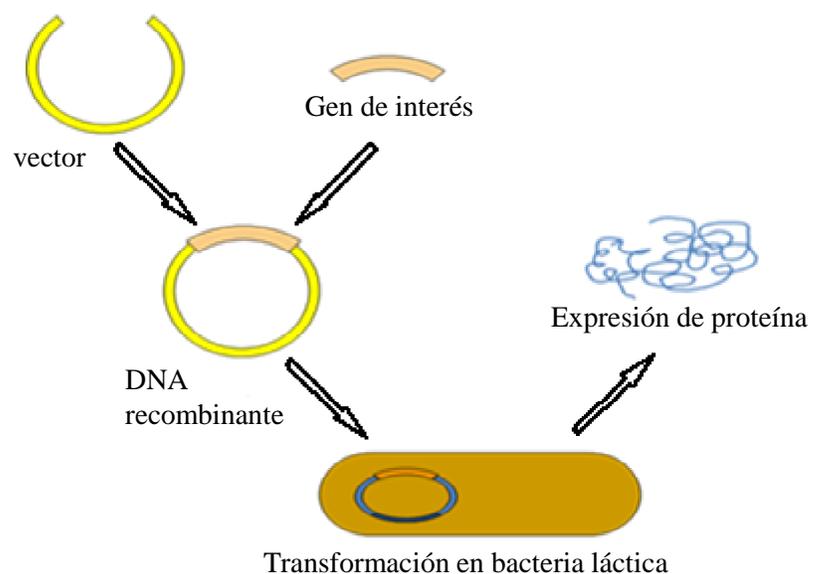


Figura 1. Proceso para producir una proteína heteróloga en bacterias lácticas.

ácido láctico. Hasta la fecha esta BL ha sido la más estudiada, por lo cual se han diseñado varias herramientas moleculares para expresar una amplia variedad de antígenos y moléculas terapéuticas (Tabla 3) de forma intra o extra celular, las cuales pueden ser presentadas al sistema inmunológico (12, 13). Esto se hace introduciendo dentro de la bacteria un plásmido modificado genéticamente para que contenga el gen de interés, lo reproduzca y exprese de manera correcta y funcional (Fig. 1).

Algunos grupos de investigadores se han enfocado en estudiar el uso de esta bacteria como vector de expresión de proteínas que puedan ayudar en la prevención de la colitis. En 2004, Vandembroucke y colaboradores, construyeron una cepa de *L. lactis* capaz de producir un TFF (Trefoil Factor) biológicamente activo, que es un factor con un rol importante en la reparación y protección del epitelio gastrointestinal. La cepa fue administrada de forma oral diariamente en ratones que presentaban colitis inducida por DSS, dando como resultado una protección contra la colitis inducida y un descenso en la mortalidad y en la pérdida de peso (citado por 14). Otra ventaja que presenta *L. lactis* para la producción de vacunas es que su pared de peptidoglicanos es un adyuvante natural, lo cual puede aumentar la respuesta inmunológica (14). El grupo de Peppelenbosch y co-

laboradores hicieron en 2006 la primera prueba en pacientes con la enfermedad de Crohn, a quienes se les administró vía oral *L. lactis* recombinante secretora de IL-10 durante una semana. Los resultados que obtuvieron no mostraron una gran diferencia en la mejoría de esta enfermedad, pero observaron que la administración de este tipo de bacterias es segura y puede contenerse biológicamente. Esto llevó a la conclusión de que el método puede llegar a tener aplicaciones clínicas favorables para el tratamiento de las EII (reseñado en 14).

CONCLUSIONES

El hecho de que aun no se caracterice completamente cuáles son las causas que generan las EII hace más difícil el poder encontrar un medicamento que pueda prevenirlas o curarlas. Como se mencionó, los tratamientos actuales no son efectivos y generan mayor incomodidad para los pacientes, así como un mayor gasto económico. La necesidad de encontrar una terapia más eficaz, menos costosa y menos dañina para pacientes con EII, además de que se ha incrementado la aparición de estas enfermedades en países desarrollados, ha propiciado que cada vez se unan mas grupos de investigadores a buscar mejores alternativas. La mas estudiada hasta la fecha han sido las bacterias lácticas, que por sus características particulares son buenos candidatos para utilizarse

como vehículos de expresión de proteínas recombinantes con beneficio terapéutico, pudiendo ser una mejor alternativa de vacunación, con mayor beneficio para el ser humano y de un menor costo.

Los trabajos realizados hasta la fecha, que involucran el uso de bacterias lácticas como posible terapia para estas enfermedades, han mostrado resultados favorables en modelos murinos; esto da un inicio para seguir investigando acerca de los potenciales clínicos que tienen estas bacterias manipuladas genéticamente para el tratamiento de las EII. El método puede ser usado para otras proteínas terapéuticas que sean difíciles de producir en las cantidades requeridas. Algunos propuestas que ya se están estudiando incluyen vacunas para generar una respuesta inmunológica contra el HPV, contra rotavirus, *Giardia lamblia* (15), el virus del dengue (16), producción de IFN- γ biológicamente activa, entre muchas otras. La utilidad de estas bacterias es innumerable, se ha visto que la mayoría de las proteínas heterólogas que se han logrado expresar funcionan de manera correcta, lo que da paso a que esta propuesta de terapia se tome en serio y se haga más investigación al respecto, tal vez en algún futuro podamos tener una vacuna funcional contra HIV o generar una mejor alternativa terapéutica para personas dependientes de insulina.

REFERENCIAS

1. Dignass AU, Baumgart DC, Sturm A (2004) Review article: the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease-immunology and repair mechanisms. *Aliment Pharmacol Ther* 20:9-17.
2. Hanauer SB (2006) Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 12(1):S3- S9.
3. Shanahan F (2004) Probiotics in inflammatory bowel disease- therapeutic rationale and role. *Adv Drug Deliv Rev* 56:809-818.
4. Steidler L (2001) Microbiological and immunological strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Microbes Infect* 3:1157-1166.

5. Caprilli R, Viscido A, Guagnozzi D (2002) Review article: biological agents in the treatment of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16:1579-1590.
6. Lim WC, Hanauer SB (2004) Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord* 4(2):66-85.
7. Papachristou GI, Plevy S (2004) Novel biologics in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am* 33:251-269.
8. Strober W, Fuss JM, Blumberg RS (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 20:495-549.
9. Kopp-Hoolihan L (2001) Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* 101:229-241.
10. Rolfe RD (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 130:396S-402S.
11. O'Mahony L, Sheil B, Shanahan F (2007) Probiotic effects on inflammatory bowel disease. *J Nutr* 137:819S- 824S.
12. Langella P, Cortes-Perez NG, Lefevre F, Corthier G, Adel-Patient K, Bermudez-Humarán LG (2007) Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine* 25:6581-6588.
13. Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, Freitas DA, Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG, Nouaille S, Ribeiro LA, Leclercq S, Gabriel JE, Guimaraes VD, Oliveira MN, Charlier C, Gautier M, Langella P (2005) Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microbial cell factories*. <http://www.microbialcellfactories.com/content/4/1/2> [revisado el 17 de febrero de 2007].
14. Wells JM, Mercenier A (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6:349-362.
15. Lee P, Faubert GM (2006) Expression of the *Giardia lamblia* cyst wall protein 2 in *Lactococcus lactis*. *Microbiol* 152:1981-1990.
16. Alonso S, Sim ACN, Lin W, Tan GKX, Sim MST, Chow VTK (2008) Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. *Vaccine* 26:1145- 1154.

LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA Y LAS α -CONOTOXINAS*

Estuardo López Vera

RESUMEN

Los caracoles marinos del género *Conus*, utilizan venenos para la captura de sus presas. Sus venenos están compuesto por un vasto número de toxinas. Estas toxinas, que se conocen como conotoxinas, son usualmente péptidos pequeños, que selectivamente se unen a diferentes blancos moleculares, particularmente a receptores y canales iónicos; entre otros a los receptores nicotínicos de acetilcolina. El estudio de estas conotoxinas (α -conotoxinas) ha sido útil para entender el papel fisiológico de estos receptores.

PALABRAS CLAVE: Caracoles marinos, receptores nicotínicos de acetilcolina, conotoxinas.

ABSTRACT

Cone snails (*Conus*) are marine gastropods that use venom as the major weapon for prey capture. Their venoms are composed by a vast number of specialized toxins that selectively target particular receptors and ion channels; among others, the nicotinic acetylcholine receptors. Studies of conotoxins (α -conotoxins) have been useful for understanding the physiological role of these receptors.

KEY WORDS: Cone snails, nicotinic acetylcholine receptors, conotoxins.

INTRODUCCIÓN

Diversos tipos de organismos tales como víboras, arañas, insectos, escorpiones y caracoles producen venenos que contienen diferentes toxinas que les permiten paralizar o matar a sus presas. Un solo veneno puede contener varias toxinas letales cuyos mecanismos de acción se basan en interacciones con receptores de neurotransmisores, efectos en canales iónicos y alteraciones en la actividad de diferentes enzimas. Tales toxinas han servido en gran medida como herramientas moleculares para entender el funcionamiento de los sistemas nervioso y muscular, principalmente de mamíferos. Además, existe la esperanza que el estudio minucioso de las toxinas pueda proveer análogos con propiedades terapéuticas o pesticidas.

Los estudios realizados en tratar de dilucidar los mecanismos de acción de diversos venenos datan desde principios del siglo pasado. Dentro de éstos, destacan los estudios clásicos realizados por Claude Bernard con el uso del curare (sustancia obtenida de la planta *Chondrodendron tomentosum* y usada por los jíbaros del Amazonas en sus flechas para paralizar a sus presas) en la respuesta de la contracción muscular, donde describe que es un supresor de la respuesta en la entonces llamada sustancia receptiva que más tarde J. N. Langley la acuñó con el nombre de receptor, término que aún prevalece hoy en día. El uso de otras toxinas como son las llamadas α -neurotoxinas (i.e α -bungarotoxina) de víboras han sido muy útiles para caracterizar al receptor nicotínico de acetilcolina (1, 2).

La designación de α -toxina se debió a la velocidad de movimiento de dos bungarotoxinas en los experimentos de electroforesis en almidón, posteriormente el sufijo α fue usado para designar el sitio de acción post-sináptico.

RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA

Existen dos tipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) en vertebrados: los tipos muscular que se encuentran en la parte post-sináptica en la placa neuromuscular y los tipos neuronal presentes tanto pre como post-sinápticamente en el sistema nervioso periférico y central (3, 4).

Se sabe que ambos tipos están constituidos por 5 subunidades homólogas formando un poro central por el cual conducen cationes, cuan-

*Recibido: 1 de abril de 2009 Aceptado: 10 noviembre de 2009
Unidad de Ecología Marina. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. C.P. 04510, México D.F. Tel: 5623-0222 ext. 45375. Correo E: vera@icmyl.unam.mx

do se une su ligando natural (acetilcolina). En el caso de los receptores musculares estas subunidades son $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$ en músculo fetal, con la sustitución de la subunidad γ por la subunidad ϵ en el adulto. A diferencia de éstos, los receptores neuronales sólo están constituidos por combinaciones de subunidades α y β , siendo la subunidad α donde se encuentra el sitio de unión de acetilcolina y con ello de la activación del canal. Sin embargo, nueve subunidades α (α_2 - α_{10}) y tres subunidades β (β_2 - β_4) han sido clonadas. Por lo que diferentes subunidades de nAChR pueden combinarse de varias maneras, con propiedades farmacológicas y electrofisiológicas distintas (Fig. 1).

CONOTOXINAS

Durante los últimos 30 años, se le ha dado un particular interés al estudio de los componentes del veneno de los caracoles marinos de la superfamilia Conoidea, en especial al de los caracoles del género *Conus*, que son uno de los grupos marinos con mayor éxito hoy en día, ya que se conocen alrededor de 500 especies. El veneno de cada caracol está constituido por 50 a 200 péptidos, todos con la característica de ser biológicamente activos. Muchos de estos péptidos están formados de 6 a 40 residuos de aminoácidos, pero la mayoría contiene de 12 a 30. Hasta la fecha, han sido aislados y caracterizados, más de 100 péptidos de diferentes especies de *Conus*, con propiedades diversas en cuanto a las interacciones con sus blancos.

Los blancos de acción de estos venenos son canales iónicos y/o receptores muy específicos y las toxinas, llamadas conotoxinas, pueden discriminar entre receptores muy similares, característica que las hace ser muy útiles en la investigación farmacológica a diferencia de muchas otras drogas, que interactúan

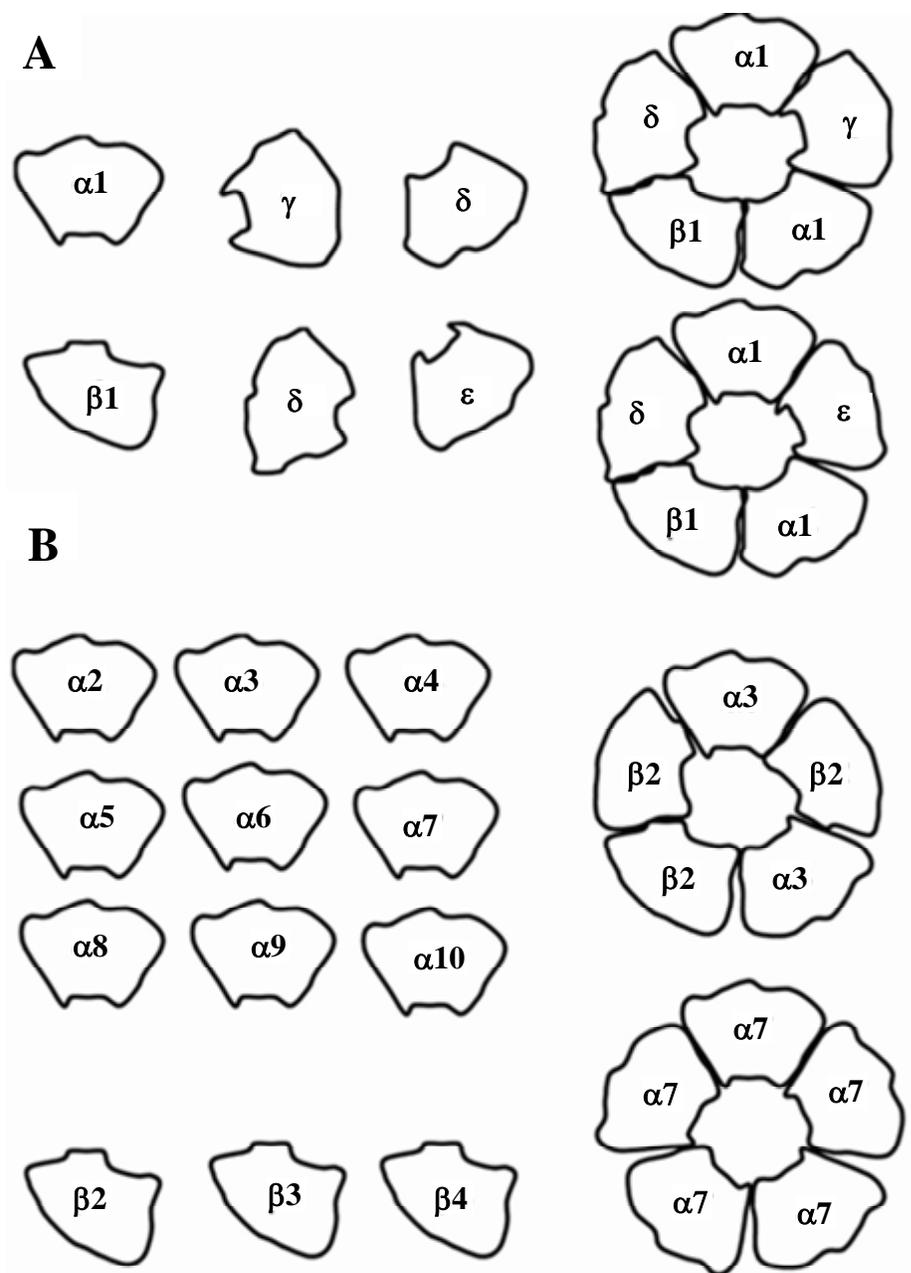


Figura 1. Subunidades de nAChRs y ejemplos de algunas configuraciones funcionales. A. Representación de las 6 subunidades individuales que conforman el subtipo muscular y los dos subtipos fetal y adulto representados en forma de pentámero. B. Las diferentes subunidades tanto α como β ; se ejemplifica en la forma de homómero el subtipo neuronal α_7 .

con más de un tipo de receptor. Así mismo, estos venenos son prácticos para el estudio de la interacción ligando-receptor a nivel de biología molecular. Esto ha llevado a clasificarlos en diferentes familias farmacológicas, por mencionar algunas se tienen las familias: alfa, mu, omega y kappa, antagonistas de

nAChR, canales de sodio, canales de calcio y canales de potasio respectivamente (5).

α -CONOTOXINAS

Las α -conotoxinas han sido muy estudiadas, por el alto grado de especificidad que presentan por sus blancos moleculares, los nAChRs. La es-

pecificidad de estas α -conotoxinas se debe a que son antagonistas competitivos, esto implica que actúan sobre el sitio de unión donde interacciona el ligando natural para abrir el canal iónico, que sería en la interfase entre dos subunidades α o en la interfase entre una subunidad α y otra cualquiera, por ejemplo $\alpha1\gamma$, $\alpha1\epsilon$, $\alpha7\alpha7$ y $\alpha3\beta4$. La α A-OIVB conotoxina es específica por la interfase $\alpha1\gamma$ y la α A-EIVA conotoxina por la interfase $\alpha1\epsilon$ para el tipo muscular de nAChR. Existen otras conotoxinas (α -MI) que no pueden diferenciar entre estas dos interfaces y la inhibición es solamente sobre la interfase $\alpha1\delta$, por lo cual el bloqueo sería para ambos subtipos, adulto y fetal. Además de estas α -conotoxinas competitivas, hay las que no son antagonistas competitivos de los nAChRs y la forma de actuar es mediante la oclusión del poro (ψ -conotoxinas) (6-9).

Para el caso de α -conotoxinas que inhiben los nAChRs de tipo neuronal, tenemos como representantes a dos α -conotoxinas α -ImI y α -ImII, aisladas ambas del caracol *Conus imperialis*, estas toxinas son péptidos constituidos por 12 aminoácidos y difieren entre ellas por solo 3 aminoácidos (10). Ambas α -conotoxinas son inhibitoras del subtipo $\alpha7$ de los nAChRs; la α -ImI inhibe de manera competitiva, mientras que α -ImII es no competitiva. Estudios de mutagénesis sobre las subunidades α y sustituciones de algunos de los aminoácidos en α -ImII, en especial la arginina 6, sugieren que el sitio de unión es en la parte extracelular del receptor y no en el poro(11). Recientemente se caracterizó la conotoxina α -RgIA, ésta conotoxina es única en el sentido que bloquea de forma específica y potente al subtipo $\alpha9\alpha10$ de los nAChRs (Fig. 2; Tabla 1)(12).

Como puede observarse, las α -

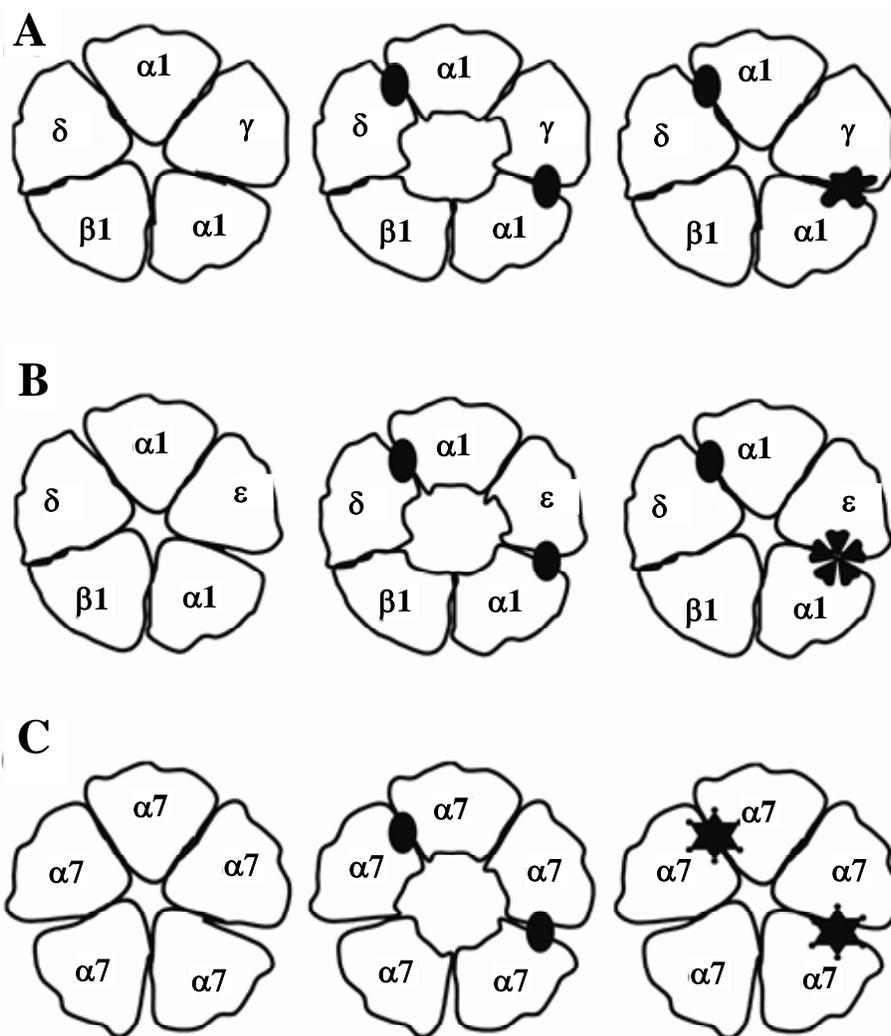


Figura 2. Los sitios de unión del ligando natural y algunas α -conotoxinas. Cada panel (A y B) muestra el subtipo muscular fetal y adulto de los nAChRs respectivamente. C. es la representación del subtipo neuronal. En ausencia de acetilcolina (óvalo negro) los receptores están cerrados (columna izquierda). Cuando se unen dos moléculas de acetilcolina un proceso de apertura ocurre (columna de en medio). La columna de la derecha se muestra el efecto de diferentes conotoxinas. Los mecanismos de acción de éstas es de manera competitiva.

conotoxinas son poderosas herramientas en el propio estudio de los nAChRs, ya que ayudan a definir los acontecimientos y mecanismos moleculares en los que están involucrados.

POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS o DE DIAGNÓSTICO

El estudio de los venenos de caracoles marinos de la superfamilia Conoidea nos ofrece una gran gama de posibles fármacos para el trata-

miento de enfermedades que afectan a los humanos o bien como herramientas de diagnóstico.

Diversas evidencias experimentales mencionan la participación de los nAChRs en procesos de dolor. El subtipo $\alpha9\alpha10$ se sabe que se expresa en células pilosas del oído interno, en neuronas en el asta dorsal de la médula espinal, en queratinocitos de la piel y en linfocitos. Al momento de sufrir una lesión hay un incremento de células del sistema inmunológico

en la zona lastimada. Suministros de la α -conotoxina RgIA en modelos de dolor en ratón, han demostrado que este reclutamiento de células del sistema inmune se ve reducido y presenta propiedades analgésicas (13).

El rhabdomyosarcoma es una forma común de un tipo de tumor en tejido blando en niños. En esta patología se expresa el subtipo muscular fetal de nAChR y ha sido propuesta la subunidad γ como un marcador de diagnóstico para poder diferenciar esta forma de neoplasia maligna de otros tumores o bien del tejido normal. Debido a que la conotoxina α A-OIVB presenta una alta especificidad por la interfase $\alpha 1\gamma$, ésta podría ser útil para este propósito (14).

TABLA 1

Nombre, fuente de obtención y subtipo de acción para los nAChR de algunas alfa conotoxinas

Toxina	Especie	Subtipo
α -MI	<i>C. magus</i>	$\alpha 1\delta \gg \alpha 1\gamma$
α -MII	<i>C. magus</i>	$\alpha 3\beta 2 = \alpha 6\beta 2\beta 3$
α -SI	<i>C. striatus</i>	$\alpha/\delta, \alpha/\gamma$
α -EI	<i>C. erminus</i>	$\alpha 1\delta = \alpha 1\delta$
α -ImI	<i>C. imperialis</i>	$\alpha 7$
α -ImII	<i>C. imperialis</i>	$\alpha 7$
α -GI	<i>C. geographus</i>	$\alpha\delta, \alpha\gamma$
α -EpI	<i>C. episcopatus</i>	$\alpha 7, \alpha 3\beta 4$
α -AuIB	<i>C. aulicus</i>	$\alpha 3\beta 4$
α -GIC	<i>C. geographus</i>	$\alpha 3\beta 2$
α -GID	<i>C. geographus</i>	$\alpha 7, \alpha 3\beta 2, \alpha 4\beta 2$
a-PIA	<i>C. purpurascens</i>	$\alpha 6\beta 2\beta 3 > \alpha 3\beta 2$

REFERENCIAS

- Bernard C (1857) Legon sur les effects des substances toxiques et medicamenteuses. París, J B Bailliere et Fils, p 488.
- Langley JN (1905) On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive substances". Part IV. The effect of curari and of some other substances on the nicotina response of the sartorius and gastrocnemius muscles of the frog. *J Physiol* 33:73-108.
- Changeux JP, Devillers-Thiéry A, Chemouilli P (1984) Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science* 225:1335-1345.
- Nirathanan S, Gwee MC (2004) Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J Pharmacol Sci* 94:1-17.
- López-Vera E, Aguilar Ramírez MB, Heimer de la Cotera E (2006) Toxinas de caracoles marinos del Género *Conus*. *Ciencia* 57:47-51.
- Teichert RW, Rivier J, Torres J, Dykert J, Miller C, Olivera BM (2005) A uniquely selective inhibitor of the mammalian fetal neuromuscular nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* 25:732-6.
- Jacobsen R, Yoshikami D, Ellison M, Martinez J, Gray W R, Cartier GE, Shon KJ, Groebe DR, Abramson SN, Olivera BM, McIntosh JM (1997) Differential targeting of nicotinic acetylcholine receptors by novel alphaA-conotoxins. *J Biol Chem* 272:22531-22537.
- McIntosh JM, Santos AD, Olivera BM (1999) Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annu Rev Biochem* 68:59-88.
- Shon KJ, Grilley M, Jacobsen R, Cartier GE, Hopkins C, Gray WR, Watkins M, Hillyard DR, Rivier J, Torres J, Yoshikami D, Olivera BM (1997) A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 36:9581-9587.
- Ellison M, Gao F, Wang HL, Sine SM, McIntosh JM, Olivera BM (2004) Alpha-conotoxins ImI and ImII target distinct regions of the human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and distinguish human nicotinic receptor subtypes. *Biochemistry* 43:16019-16026.

11. Ellison M, McIntosh JM, Olivera BM (2003) Alpha-conotoxins ImI and ImII. Similar alpha 7 nicotinic receptor antagonists act at different sites. *J Biol Chem* 278:757-764.
12. Ellison M, Haberlandt C, Gomez-Casati ME, Watkins M, Elgoyhen AB, McIntosh JM, Olivera BM (2006) Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry* 45:1511-1517.
13. Vincler M, Wittenauer S, Parker R, Ellison M, Olivera BM, McIntosh JM (2006) Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci* 103:17880-17884.
14. Teichert RW, Rivier J, Torres J, Dykert J, Miller C, Olivera BM (2005) A uniquely selective inhibitor of the mammalian fetal neuromuscular nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* 25:732-736.

CISTOGÉNESIS DE *TOXOPLASMA GONDII**

Norma Rivera Fernández y Ricardo Mondragón Flores

RESUMEN

Con la alta incidencia de la enfermedad del VIH-SIDA, la toxoplasmosis ha vuelto a emerger y se ha posicionado como una de las enfermedades oportunistas más comunes en el mundo. Su diagnóstico se realiza principalmente mediante el uso de técnicas de tipo inmunológico, recientemente se ha estandarizado la técnica de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) que detecta secuencias específicas del ADN de *Toxoplasma* tanto en sangre como en biopsias de tejidos de pacientes infectados. La aplicación de tratamientos farmacológicos y vacunas contra *Toxoplasma*, ha tenido un avance limitado debido en gran medida a la falta de modelos experimentales que permitan una exitosa diferenciación del taquizoíto a bradizoíto con la consecutiva inducción de la cistogénesis *in vitro*. La inducción eficiente y el aislamiento exitoso de preparaciones enriquecidas en quistes tisulares, permitirá la caracterización de su composición molecular y de sus propiedades inmunoprotectoras. Adicionalmente, permitirá la evaluación y el diseño de fármacos que sean capaces de atravesar la pared del quiste tisular a fin de eliminar a los parásitos ahí alojados.

PALABRAS CLAVE: *Toxoplasma gondii*, bradizoítos, cistogénesis.

INTRODUCCIÓN

El parásito apicomplexa *Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado que produce una enfermedad parasítica crónica normalmente asintomática en individuos inmunocompetentes, pero que en personas inmunocomprometidas como las infectadas con el virus del VIH-SIDA, o que están sometidas a tratamientos anticancerígenos o a inmunosupresores, produce encefalitis y muerte. Se ha reportado una mortalidad por en-

cefalitis toxoplásmica a nivel mundial hasta del 30% en enfermos inmunocomprometidos e infectados con *Toxoplasma*. El control farmacológico de esta parasitosis es hasta la fecha, la estrategia más utilizada debido a los esfuerzos poco exitosos en el desarrollo de vacunas contra este parásito (1). Sin embargo, la baja eficacia, los efectos secundarios y el desarrollo de resistencia a los fármacos disponibles en el mercado, junto con su incapacidad de atravesar

ABSTRACT

With the rise of incidence of the AIDS-HIV disease, toxoplasmosis has re-emerged and positioned as one the most common opportunistic diseases in the world. Diagnosis of this parasitosis is achieved mainly by immunological methods; recently the technique of the polymerase chain reaction (PCR) has been standardized to detect specific parasite's DNA sequences in blood and tissues of infected patients. Application of pharmacological treatments and vaccines against *Toxoplasma* has observed a limited advance due to the lack of experimental conditions that allow a successful differentiation from the tachyzoite to the bradyzoite form with the consecutive induction of cystogenesis *in vitro*. Efficient induction and successful isolation of enriched preparations with tissue cysts, will allow the characterization of their molecular composition and immunoprotector properties. In addition, it will allow the evaluation and design of drugs able to transverse the cyst wall in order to eliminate the intra-cyst parasites.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*, bradyzoite, cystogenesis.

la pared quística, han representado un problema serio en el uso de fármacos contra este parásito. Por tanto, la búsqueda de posibles blancos terapéuticos en *Toxoplasma*, así como de moléculas con potenciales aplicaciones inmunoprotectoras, representan uno de los principales retos a futuro para la resolución de esta parasitosis. Debido a que en pacientes con SIDA, *T. gondii* ocasiona una encefalitis fatal necrosante que conduce a la muerte, la toxoplasmosis ha sido considerada

*Recibido: 7 de abril de 2009 Aceptado: 1 de diciembre de 2009

Laboratorio de Patógenos Intracelulares. Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México DF. Correo E: rmflores@cinvestav.mx

dentro de las diez infecciones oportunistas más peligrosas en pacientes con esta enfermedad y causante de un 30% de mortalidad (2). En el humano, la infección con *Toxoplasma gondii* ocurre a nivel intestinal e inicia con la ingesta de ooquistes liberados en las heces de gatos enfermos y que contienen a los esporozoítos o bien por la ingesta de carne mal cocida, contaminada con quistes tisulares en los cuales se alojan los bradizoítos. Tanto los esporozoítos como los bradizoítos invaden el epitelio intestinal para posteriormente diferenciarse a la forma altamente invasiva y replicativa conocida como taquizoíto, la disemina el parásito por todos los tejidos del huésped. Todas las formas de diferenciación del *Toxoplasma* son virulentas e intracelulares obligadas. Es decir, que sólo pueden desarrollarse y proliferar dentro de la célula. Una vez dentro de la célula blanco, el taquizoíto lleva a cabo su proliferación intracelular por endodiogenia, un proceso asexual de división celular. Como resultado de la infección, se activa la respuesta inmune del huésped con la producción y liberación de interferón gamma (IFN- γ) por macrófagos activados, los cuales son capaces de fagocitar y destruir taquizoítos que pudieran encontrarse a nivel extracelular en los momentos previos a la invasión celular. La acción de los macrófagos o de otras células de defensa o de moléculas efectoras como los anticuerpos, complemento, etc., no son efectivos contra la forma intracelular del parásito. La presencia del IFN- γ activa por otro lado, un proceso de diferenciación en *Toxoplasma* que conduce a la transformación de taquizoítos a bradizoítos, con la consecutiva modificación de la célula huésped infectada en un quiste tisular, un proceso que se conoce como cistogénesis. Los bradizoítos permanecen en estado de latencia dentro de los quistes tisulares a lo largo de la vida del huésped. El mecanismo de

diferenciación de la forma de taquizoíto a bradizoíto y los eventos moleculares de su regulación aún se desconocen. En términos de quimioterapia anti-toxoplásmica, hasta ahora no existen fármacos capaces de eliminar los quistes tisulares presentes en los huéspedes infectados ya que aún se desconocen las propiedades bioquímicas de los citados quistes tisulares así como de los bradizoítos alojados en su interior (2).

Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

El ciclo de vida de *T. gondii* involucra a dos tipos de huéspedes: los definitivos que incluyen a los felinos en quienes se desarrolla el ciclo sexual de reproducción y los huéspedes intermedios, como son animales de sangre caliente no felinos y el hombre, en los cuales se realiza la reproducción asexual del parásito. El ciclo inicia cuando el huésped definitivo (gato doméstico) ingiere presas en cuyos tejidos se encuentran quistes tisulares conteniendo bradizoítos, que son liberados a la luz intestinal por las enzimas digestivas del gato (3). Los bradizoítos invaden a los enterocitos intestinales y proliferan, diferenciándose en un macrogameto (célula femenina) y un microgameto (célula masculina). El microgameto posee un flagelo que le permite desplazarse sobre el epitelio intestinal para fecundar al macrogameto lo que da origen a un cigoto. Este cigoto se transforma en un ooquiste inmaduro no infectivo que es liberado al medio ambiente en las heces, contaminando agua y suelo. En condiciones de temperatura y humedad adecuadas, los ooquistes maduran a un estado infectivo conteniendo en su interior ocho esporozoítos que al ser ingeridos por un huésped intermedio, inician la infección. El huésped intermedio que incluye a animales de sangre caliente (vacas, borregos, cerdos, etc.) puede infectarse por la

ingesta de ooquistes maduros, los cuales como resultado del proceso digestivo, liberan a los esporozoítos que infectan a las células del epitelio intestinal. Dentro de estas células, los esporozoítos se transforman por diferenciación en taquizoítos, los cuales proliferan rápidamente dentro de una vacuola parasitófora (VP) por un proceso asexual de división celular conocido como endodiogenia, por el cual se forman dos parásitos de una célula madre. Al saturar el espacio intravacuolar, los taquizoítos salen de la célula destruyéndola e invadiendo células vecinas (3). Durante la diseminación tisular del *Toxoplasma*, se activa el sistema inmune con la participación de diversas células efectoras incluyendo los linfocitos B con la consecutiva producción de anticuerpos así como de linfocitos T y macrófagos que participan con acciones citotóxicas directas y mediante la secreción de citocinas tales como el interferón gama, el factor de necrosis tumoral y el óxido nítrico. Se ha determinado que la presencia de las citocinas mencionadas activan mecanismos moleculares no bien caracterizados, que resultan en la diferenciación de los taquizoítos en bradizoítos con la consecutiva transformación de la célula infectada en un quiste tisular. Estos quistes tisulares que contienen bradizoítos se localizan en todos los tejidos de los animales infectados y representan una forma de diseminación de la toxoplasmosis al ser ingerida la carne contaminada con quistes tisulares. En el hombre, tanto la ingesta de ooquistes maduros presentes en agua potable u hortalizas contaminadas o de carne mal cocida contaminada con quistes tisulares conteniendo bradizoítos representan formas comunes de transmisión de la parasitosis. Una vez que los esporozoítos o los bradizoítos invaden al epitelio intestinal humano, se diferencian en la forma de taquizoíto. Los taquizoítos prolifere-

ran y atraviesan la lámina basal intestinal para iniciar su diseminación tisular por vía sanguínea o linfática. Los quistes tisulares permanecen en forma latente hasta por varios años iniciando así una infección crónica (4). En individuos inmunológicamente no comprometidos y crónicamente infectados con *Toxoplasma*, los bradizoítos salen del quiste tisular y se diferencian a taquizoítos, diseminándose por todo el organismo. Esta reactivación de los parásitos de un estado crónico a uno agudo, se asocia con la migración de los taquizoítos a través de la barrera hemato-encefálica hacia órganos vitales como el cerebro en donde producen cuadros de encefalitis y posteriormente muerte. Cuando la infección con *Toxoplasma* ocurre durante el embarazo, el parásito alcanza la placenta e infecta al feto, produciendo daños oculares, cerebrales y aborto (5). En el modelo de toxoplasmosis murina, el tiempo en que los bradizoítos invaden los tejidos después de la infección vía oral es de 2 horas con la conversión a taquizoítos después de 18 horas. A las 24 horas post-infección se detecta una clara parasitemia, y a los 4 días, la distribución a los diferentes órganos. Estudios recientes sugieren que los bradizoítos durante el proceso de invasión, determinan mediante procesos aun no esclarecidos si formarán quistes tisulares o taquizoítos. La formación de quistes se observa 6 días después de la infección (5).

Formas clonotípicas y cistogénesis *in vitro* de *Toxoplasma gondii*

Se ha descrito la existencia de tres formas clonotípicas de *Toxoplasma* de acuerdo a su genoma (Tipo I, II y III). Además de las diferencias genotípicas de las poblaciones clonotípicas de *Toxoplasma*, también se ha hecho una correlación con su grado de virulencia y distribución preferencial en ciertas especies animales. Ciertas cepas de baja virulencia de *Toxoplasma* del

tipo II y III presentan una predisposición al enquistamiento *in vitro* bajo condiciones de cultivo celular. Este tipo de cepas han sido utilizadas en el estudio del proceso de diferenciación de taquizoítos a bradizoítos y del proceso de enquistamiento celular o cistogénesis. Considerando la importancia de la cistogénesis en el ciclo biológico de *T. gondii* y en la patogénesis de la enfermedad, se han desarrollado diferentes métodos para inducir la diferenciación de taquizoítos a bradizoítos y quistes tisulares en cultivos de células infectadas (6). No obstante que la inducción del enquistamiento de *Toxoplasma in vitro* ha sido reportada desde la década de los sesenta, las bases moleculares por las cuales se da este fenómeno aún no están caracterizadas. Estudios previos realizados *in vitro* muestran que los factores inmunológicos no son siempre necesarios para la inducción de la formación del quiste tisular (4, 7). Hasta el momento se han estudiado factores de estrés que inducen el desarrollo de bradizoítos en células infectadas tales como: pH alcalino, IFN- γ y otras citocinas pro-inflamatorias, alta temperatura, drogas y depleción de nutrientes (8).

pH alcalino. El mantenimiento de células infectadas con *Toxoplasma* en medio de cultivo con pH alcalino (8.0-8.2), es la estrategia más comúnmente utilizada para inducir la conversión de taquizoítos a bradizoítos *in vitro*, los bradizoítos obtenidos mediante este método presentan un fenotipo definido (9). La estrategia consiste en infectar el cultivo celular con taquizoítos de *T. gondii* por un par de horas en condiciones fisiológicas de pH (7.2-7.4), a fin de permitir la invasión de los parásitos para después cambiar el medio de cultivo a pH alcalino ajustado con KOH. Las células infectadas son cultivadas, por lo general en una atmósfera sin CO₂ exógeno, para evi-

tar la variación de pH. Sin embargo bajo estas condiciones, el cultivo celular sufre severos daños que limitan el estudio del desarrollo de los bradizoítos (9). La exposición de los taquizoítos extracelulares a pH alcalino durante una hora previa a la invasión de la célula huésped, activa la inducción de la conversión a bradizoítos, así se evita el daño sobre la célula huésped, pero, el rango de conversión es mucho menor al obtenido al cultivar las células invadidas con el parásito en pH alcalino. Tanto el daño directo al parásito como los cambios en la célula huésped pueden detonar la conversión (4).

IFN- γ y otras citocinas pro-inflamatorias. El IFN- γ es una citocina que participa en la inducción y regulación de la respuesta inmune celular que en el caso de la toxoplasmosis contribuye, entre otros aspectos, a la activación de macrófagos induciendo así un grado de resistencia contra el parásito. El IFN- γ junto con otras citocinas induce varios mecanismos efectoros como son la producción de óxido nítrico y la limitación de triptofano, factores que limitan la replicación del parásito o causan su muerte (10). El cultivo de células infectadas con taquizoítos de *T. gondii* en presencia de IFN- γ induce la formación de quistes. Este método de cistogénesis, mimetiza el efecto de citocinas de la respuesta inmune sobre el parásito (8). El enquistamiento inducido por IFN- γ varía de acuerdo a la estirpe de las células huésped invadidas. En macrófagos invadidos, el enquistamiento ocurre de manera exitosa, lo cual no sucede en astrocitos de ratón y células neuronales de rata. Este método no ha funcionado con las cepas RH y VEG (11). Por otro parte, la interleucina 6 (IL-6) que se produce en procesos inflamatorios, es eficaz en la producción de quistes en fibroblastos humanos (4).

Fármacos. Dentro de los fármacos que se han utilizado con más frecuencia para inducir la cistogénesis están: pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, espiramicina, hidronaftoquinonas y macrólidos de nueva generación. La mayoría de estos fármacos disminuyen la replicación de *T. gondii*. La combinación de pirimetamina-sulfadiazina induce la interconversión con la expresión de antígenos bradizoíto-específicos. La atovacuona, es uno de los fármacos más efectivos en la interconversión y formación de quistes *in vitro* (8).

Choque térmico. Otra estrategia para inducir la conversión de *T. gondii* es la de aplicar cambios en las temperaturas de incubación de las células infectadas como factor de inducción de la diferenciación e interconversión a bradizoítos y formación de quistes *in vitro*. El procedimiento consiste en mantener las células no infectadas por dos horas a 34°C para que esta adquiere termo tolerancia. Las células son llevadas a 37°C por dos horas más, para su infección con taquizoítos de *T. gondii* y posteriormente es elevada la temperatura de incubación a 43°C durante 12-48 horas, después las células son mantenidas de nuevo a 37°C por el tiempo que dure el experimento. Bajo estas condiciones, se observa desde las 48 horas, la presencia de estructuras quísticas similares a las aisladas de cerebros de ratones infectados. Cabe mencionar que el tratamiento con calor induce la formación de quistes en cepas virulentas y avirulentas de *T. gondii* (12).

Estrés nutricional. Recientemente se ha observado que la privación de nutrientes como la arginina, bloquea de manera eficiente la replicación de *T. gondii* y dispara la diferenciación de taquizoíto a bradizoíto, así como el desarrollo *in vitro* de estructuras semejantes a quistes tisulares (12). *T.*

gondii carece de la enzima necesaria para sintetizar arginina *de novo* por lo que requiere tomar este aminoácido de la célula huésped. Al incrementar los niveles intracelulares de GMPc y AMPc de manera permanente o transitoria se ha demostrado que se puede inducir la diferenciación de *T. gondii* en la cepa PLK mas no en la RH (13).

Conversión espontánea. La transición de taquizoítos a bradizoítos puede ocurrir de manera espontánea, sin la necesidad de aplicar algún factor de estrés, sin embargo esto ocurre con una baja frecuencia. El grado de diferenciación varía de una cepa a otra. Recientemente se han descrito cambios en la fase pre-mitótica del ciclo celular, sobretudo en la fase G2 que se ha asociado con la diferenciación a bradizoítos (14). Es tema de controversia si la estirpe de la célula huésped es determinante para la interconversión de *T. gondii*. Los fibroblastos humanos son los más utilizados para estudiar el fenómeno de diferenciación. Recientemente se han hecho ensayos con células de músculo esquelético que se diferencian *in vitro* a miotubos, en los que se ha obtenido una alta frecuencia de conversión espontánea a bradizoítos a partir del sexto día post-invasión (6). Para la inducción de la formación de quistes de *T. gondii* por estrés se han utilizado diferentes líneas celulares como células Vero, fibroblastos humanos, macrófagos murinos, neuronas de rata, astrocitos y microglia, las cuales se han invadido con diferentes cepas de *T. gondii* como RH, ME 49, NTE, PLK, VEG y algunas cepas exóticas como: COUG, CAST, GPHT, MAS, FOU (6).

Morfología y proteínas estructurales de superficie de bradizoítos y quiste tisular

La diferenciación *in vitro* de *T. gondii* mediante los métodos anteriormente descritos ha permitido conocer la mor-

fología y biología de bradizoítos y quistes tisulares. Mediante el estudio de estas poblaciones de baja virulencia se ha podido determinar que los bradizoítos son una forma parasitaria intracelular de poca motilidad, baja virulencia y lenta proliferación los cuales, al igual que los taquizoítos, también se dividen por endodiogenia y transforman a la célula huésped infectada en un quiste tisular. Dentro de las características de los bradizoítos se encuentran la presencia abundante de gránulos conteniendo polisacáridos como la amilopectina, su núcleo ubicado en la parte posterior, roptrías, numerosos micronemos así como su baja motilidad y capacidad replicativa. Una propiedad adicional es su capacidad para unirse a la lectina de *Dolichos biflorus* debido a la presencia de polisacáridos en la pared del quiste (15). La figura 1 muestra quistes de *T. gondii* de ocho días obtenidos a partir de la cepa Prugniaud en células Hep-2 teñidos con la lectinas de *D. biflorus* fluorescente. El quiste tisular mide entre 50 a 70 µm y puede contener entre 1000 y 2000 bradizoítos. El tamaño del quiste depende tanto del tipo de la célula huésped, como de la edad del quiste. En los tejidos del huésped, los quistes inmaduros pueden llegar a medir hasta 5 µm y contener 2 bradizoítos en su interior. Una VP, en su formación temprana, puede contener taquizoítos o bradizoítos. La identificación de bradizoítos y de estructuras quísticas, es posible mediante técnicas histoquímicas que detecten marcadores específicos de bradizoítos y de la pared del quiste. Los bradizoítos desarrollan quistes en diversos tejidos, pero son más comunes en tejido nervioso y muscular, sin embargo no queda claro cual es la célula o tejido preferidos para esta interconversión. En bradizoítos no se observan cuerpos lipídicos, muestran reacción positiva a la tinción de ácido peryódico de

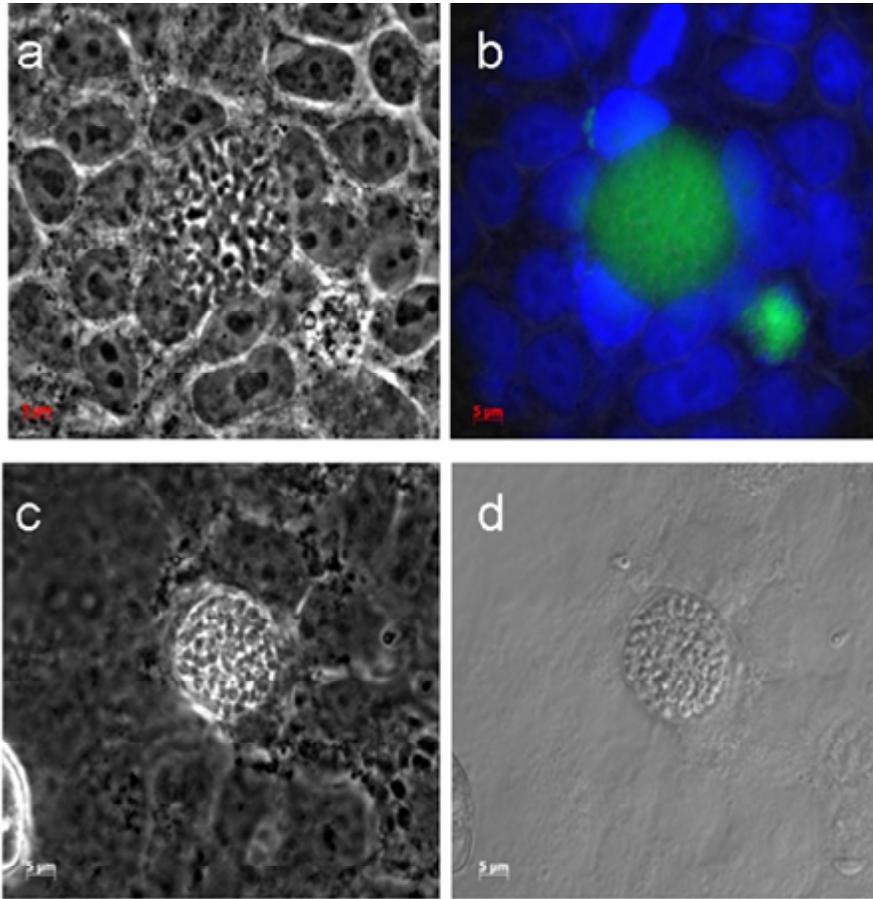


Figura 1. Quistes de *T. gondii* (cepa Prugniaud) en células Hep-2 mostradas por: **a**, contraste de fases (quiste en célula huésped); **b**, contraste de fases de quiste en célula huésped teñido con lectina *Dolichos biflorus* (verde) y con DAPI para el núcleo de célula huésped (azul); **c**, contraste de fases, quiste en sobrenadante; **d**, quiste por Nomarsky (creado por Rivera y Mondragón, 2008).

Schiff y resisten más las condiciones de ácido-pepsina (sobreviviendo hasta 2 horas en pepsina-HCl). Aparentemente la pared del quiste se forma a partir de la yuxtaposición de la membrana de la VP y de la membrana de la célula huésped, con la presencia de filamentos intermedios que lo rodean y que no están incorporados a la pared del quiste (11). Mediante el uso de antisueros policlonales se demostró que los taquizoítos son antigénicamente diferentes a los bradizoítos y que existen antígenos estado-específicos, identificados por técnicas de Western blot y ELISA. La mayoría de los antígenos identificados hasta el momento pertenecen a dos diferen-

tes familias: SAG1 y SAG2 ("surface antigens"). La familia SAG1 incluye a SAG3, (BSR)4 ("bradyzoite specific recombinant"). Las proteínas SRS 1-3

(SAG-"related sequences"), SAG5, SAG5.1 y SAG5.2 (13). SAG1 y SRS1-SRS3 están presentes únicamente en taquizoítos, BSR4 sólo en bradizoítos y SAG3 en ambos. Esta familia de proteínas juega un papel importante en el proceso de adhesión del parásito a la célula blanco. La familia SAG2 incluye a SAG2A, SAG2B, SAG2C y SAG2D. SAG2A y SAG2B, las cuales se expresan exclusivamente en taquizoítos, mientras que SAG2C y SAG2D en bradizoítos. Las enzimas y el metabolismo bioquímico de los bradizoítos no se han estudiado en detalle debido a la dificultad para obtenerlos en cantidad suficiente *in vitro*. Al utilizar técnicas de biología molecular se han podido identificar diferentes enzimas como las enolasas de taquizoítos y bradizoítos, la glucosa-6- fosfato isomerasa y la lactato deshidrogenasa (LDH) (11). Se ha demostrado que los bradizoítos poseen una ATPasa que está ausente en los taquizoítos (16). Algunas moléculas de bradizoítos y su distribución topográfica se muestran en la Tabla 1.

Conclusión

La fase de quiste tisular protege al parásito *Toxoplasma gondii* de la acción efectora del sistema inmune del huésped así como de la acción de la

TABLA 1

Moléculas de bradizoítos y su distribución topográfica (4)

Nombre de antígeno	Distribución por inmunofluorescencia
BAG1 (hsp30)	Citoplasma
BAG5	Citoplasma
BSR4	Superficie
SAG4 (antígeno de superficie)	Superficie
MAG1 (antígeno de matriz)	Matriz
CST1 (proteínas de pared del quiste)	Pared del quiste

BAG = antígeno de bradizoíto

gran mayoría de los compuestos toxoplásmicos como pirimetamina, sulfadiazina y atovacuona. Al entender mejor los eventos bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo durante el proceso de cistogénesis de *Toxoplasma gondii* y caracterizar los componentes moleculares que constituyen al quiste y a los bradizoítos, se podrán desarrollar nuevos compuestos químicos con actividad toxoplásmica que permitan el planeamiento de terapias alternativas en el tratamiento de la encefalitis toxoplásmica así como su caracterización inmunológica para la aplicación de estrategias de inmunoprotección contra este parásito.

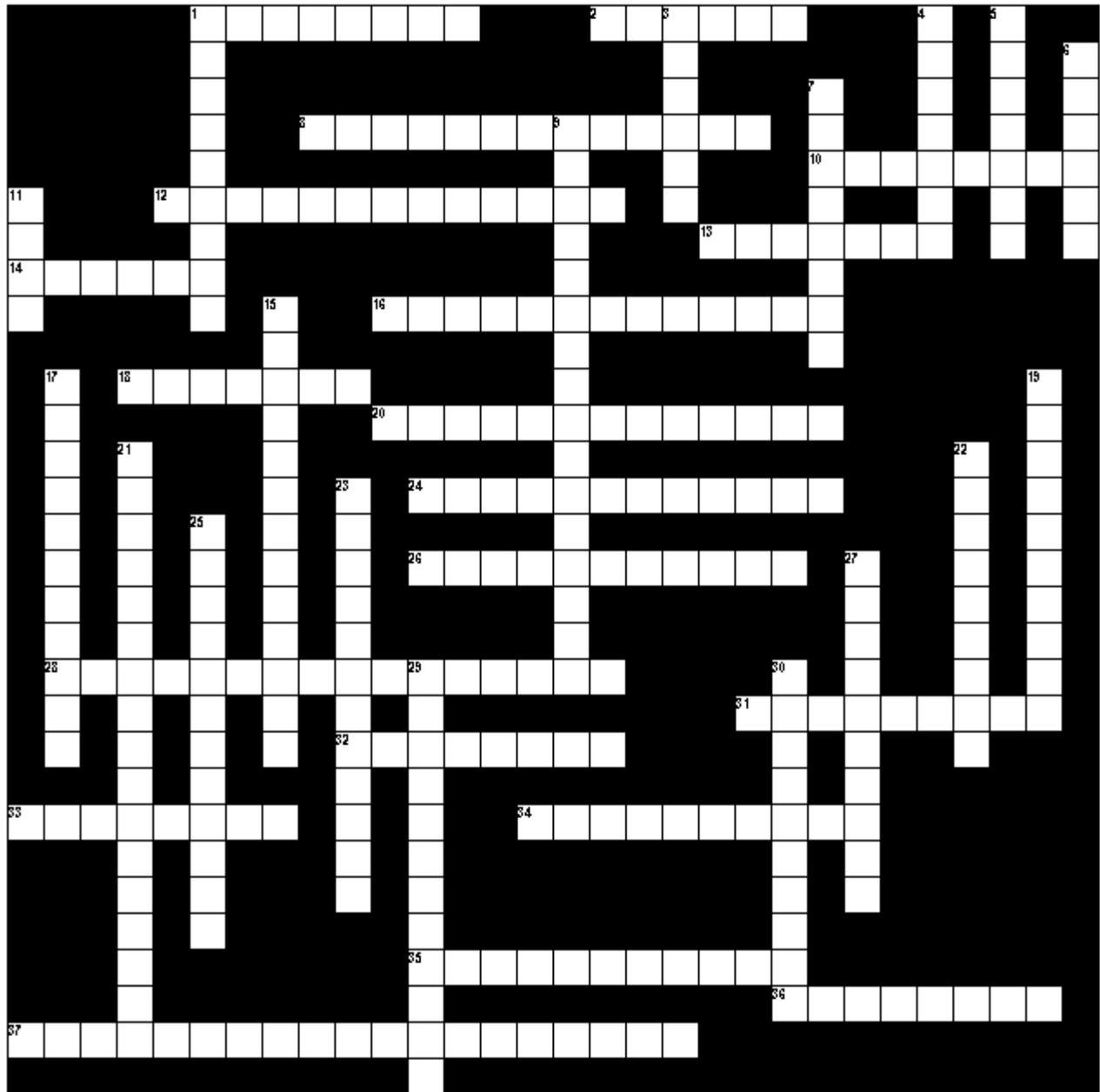
REFERENCIAS

1. McFadden DC, Camps M, Boothroyd JC (2001) Resistance as a tool in the study of old and new drug targets in *Toxoplasma*. *Drug Resist Updat* 4:79-84.
2. Luft BJ, Remington JS (1992) Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 15:211-222.
3. Sibley D, Krahenbuhl J, Adams M, Weidner E. (1986) *Toxoplasma* modify macrophages phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J Cell Biol* 103:867-874.
4. Weiss LM, Kim K (2001) The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front in Biosci* 5:d391-405.
5. Filisetti D, Candolfi E (2004) Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Sup Sanità* 40(1):71-80.
6. Fonseca M da F, Barbosa HS, Grob U, Luder KG (2008). Stress related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Bio Syst* 4:824-834.
7. Dzierszinski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS (2004) Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryotic Cell* 3:992-1003.
8. Bohne W, Holpert M, Gross U (1999) Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology* 201:248-254.
9. Soete M, Dubremetz JF (1996) *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion in vitro. *Curr. Top Microbiol Immunol* 219:76-80.
10. Lang C, Groß U, Lu CGK (2007) Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 100:191-203.
11. Lekutis C, Ferguson D, Boothroyd J (2000) *T. gondii*: Identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol*. 96:89-96.
12. Fox BA, Gigley JP, Bzik DJ (2004) *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int J Parasitol* 34:323-331.
13. Kirkman LA, Weiss LM, Kim K (2001) Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation. *Infect Immun* 69:148-153.
14. Radke JR, Gierini MN, Jerome M, White MW (2003) A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 131:119-127.
15. Fortier B, Coignard-Chatain C, M. Soete, Dubremetz JF (1996) Structure and biology of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *Seances Soc Biol Fil* 190:385-94.
16. Dubey JP (1997) Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 44:592-602.

CRUCIBIOQ

ENZIMAS: HIDROLASAS

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@laguna.fmedic.unam.mx



HORIZONTALES

- 1 Su sustrato es una proteína del tejido conjuntivo que tiene propiedades elásticas, está presente en la pared

de las grandes arterias; esta enzima se encuentra en el jugo pancreático como su precursor inactivo y rompe uniones cuyo COOH es apartado por un aminoácido apolar, preferentemente la alanina.

- 2 Aminoácido que es fundamental para la catálisis enzimática de un grupo de hidrolasas clasificadas como EC 3.4.21, en donde quedan incluidas la tripsina, la quimotripsina y la subtilisina entre otras.
- 8 Mecanismo que activa a la lipasa sensible a hormonas, enzima que ocasiona la lipólisis en el tejido adiposo lo que conduce a un incremento de ácidos grasos en la circulación y finalmente aumento de su oxidación.
- 10 Cataliza la hidrólisis de las uniones β 1,4 de N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en el peptidoglicano; se encuentra en las secreciones (saliva, lágrimas y moco) en donde actúa como una barrera frente a las infecciones; su deficiencia se ha asociado a displasias esqueléticas y a un aumento de la propensión a las infecciones.
- 12 Enzima hidrolítica (EC 3.2.1.23) responsable de la liberación de galactosa a partir de su sustrato presente en los alimentos.
- 13 Rompe las uniones α -1,4 en múltiples sitios del interior de las cadenas poliglucosídicas generando dextrinas y maltosa.
- 14 Enzima presente en los invertebrados marinos que al introducir agua rompe $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ y da lugar a 2NH_3 y CO_2 .
- 16 Encargadas de eliminar al grupo fosfato de su sustrato para dar lugar al nucleósido correspondiente.
- 18 Tiene un peso molecular inferior a 5 000 y está constituido por la asociación de aminoácidos unidos entre sí mediante uniones peptídicas.
- 20 Grupo de enzimas caracterizadas por hidrolizar uniones peptídicas, cada una de las participantes del grupo actúa en sitios altamente específicos.
- 24 Es el sustrato de la acetil-colinesterasa, enzima que se encuentra en la placa motora de los músculos y en las sinapsis de los nervios colinérgicos, la participación de esta enzima conduce a una disminución de la transmisión del impulso nervioso.
- 26 Es el precursor de una proteína que gracias a una serina-proteasa forma una red insoluble que atrapa a células sanguíneas cuando se daña un vaso sanguíneo y se forma el coágulo.
- 28 Enzima secretada por en el páncreas de los mamíferos; de este grupo por lo menos hay 3 formas diferentes: la A que separa los aminoácidos terminales hasta encontrarse arginina, lisina y prolina; la B que actúa sobre las argininas y lisinas terminales y la C que separa los aminoácidos C-terminales hasta encontrarse a una prolina.
- 31 Son precursores enzimáticos del grupo de las hidrolasas que están a un paso de transformarse en

enzimas activas cuando se les escinda una porción peptídica.

- 32 Enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo proviene de residuos de lisina o arginina.
- 33 Enzima hepática que participa en el ciclo que contribuye a detoxificación del nitrógeno, se localiza en el citosol y con su acción se produce urea y ornitina.
- 34 Enzimas que por su participación sobre algunos ésteres, dan lugar a la liberación de una molécula de ácido fosfórico.
- 35 Tipo de unión presente en disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos que por enzimas específicas finalmente se liberan monosacáridos.
- 36 Es la β -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26), participa en la digestión hidrolizando a un disacárido participante de la dieta humana; uno de sus productos es la fructosa.
- 37 Endonucleasa presente en el jugo pancreático que fracciona a su sustrato dando lugar a oligodesoxirribonucleótidos.

VERTICALES

- 1 Grupo de enzimas que tienen como función hidrolizar a moléculas que se formaron por la unión de un alcohol y un ácido, como por ejemplo los triacilgliceroles o la glucosa-6-fosfato.
- 3 Enzima producida por las células granulares del glomérulo renal, tiene acción proteolítica sobre el angiotensinógeno el que después de varias reacciones se convierte en angiotensina II que es un potente vasoconstrictor, regulador de la presencia de sodio, además de estimular la producción de aldosterona.
- 4 Producto final de la gluconeogénesis, en esta vía la última enzima es una hidrolasa que libera al ácido fosfórico.
- 5 Participa en el estómago rompiendo las proteínas en las regiones en donde el enlace peptídico está al lado del grupo amino de fenilalanina, triptofano y tirosina.
- 6 La _____ pancreática cataliza la hidrólisis de los triacilgliceroles en las posiciones 1 y 3, lo que da lugar a 2-acilgliceroles y 1,2-diacilgliceroles.
- 7 Esta enzima no se encuentra presente en los vertebrados, pero en el tracto digestivo de los herbívoros hay microorganismos que la secretan y permiten que el sustrato sea metabolizable.

- 9** Se producen cuando la fosfolipasa A₂, por la introducción de una molécula de agua libera al ácido graso correspondiente de un fosfolípido; estas estructuras son detergentes poderosos, desorganizan a las membranas celulares y provocan la lisis celular.
- 11** Pequeña molécula que con la participación de la enzima específica rompe una unión glucosídica o peptídica, entre otras.
- 15** Es proteolítica y se obtiene cuando la tripsina actúa sobre el zimógeno de esta enzima, rompiendo entre Arg 15 e Ile 16; posteriormente se lleva a cabo otra ruptura y los tres péptidos se mantienen unidos por puentes S-S.
- 17** Designación dada al grupo de enzimas dedicadas a la liberación de moléculas participantes en los complejos lipídicos.
- 19** Constituyen del 1 al 5% del contenido del genoma, estas enzimas están implicadas en una multitud de reacciones fisiológicas desde la simple digestión de las proteínas de los alimentos hasta procesos altamente regulados como por ejemplo la cascada de la coagulación sanguínea o el sistema del complemento.
- 21** Zimógeno que se sintetiza por las células exócrinas del páncreas; la forma activa de la enzima en el duodeno, rompe las uniones en donde el carboxilo proviene de fenilalanina, tripsina y tirosina.
- 22** Metabolito que se produce en la vía catalítica del AMP por la participación de la 5' nucleosidasa, que mediante una reacción hidrolítica libera fósforo inorgánico.
- 23** Esta afección, cuando es aguda, se debe a la activación prematura de las proenzimas (tripsinógeno, kaliceína, proelastasa y profosfolipasa A) las cuales provocan la autodigestión del tejido en donde se producen y con ello el inicio de la respuesta inflamatoria.
- 25** Enzimas que hidrolizan a una molécula estructural de la membrana, según su sitio de acción se clasifican en A (EC 3.1.1.32), A₂ (EC 3.1.1.4), C (EC 3.1.4.3) y D (EC 3.1.4.4).
- 27** Enzimas que tienen como función romper una estructura al introducir los elementos de una molécula de agua.
- 29** Cuando este zimógeno ingresa al duodeno desde el páncreas se activa por la enteropeptidasa y se escinde el enlace peptídico entre lisina e isoleucina y da lugar a la enzima proteolítica activa la cual es autocatalítica.
- 30** Este grupo de enzimas se sintetizan como zimógenos o proenzimas para proteger de la autodigestión al tejido donde se sintetizan.

EDWIN GERHARD KREBS (1918-2009)

M Eugenia Torres-Márquez
metorres@servidor.unam.mx

El pasado 21 de diciembre sufrimos la pérdida de un miembro importante de la comunidad bioquímica-científica, Edwin Gerhard Krebs. EG Krebs tuvo entre sus grandes contribuciones, el establecimiento de las cascadas de fosforilación-desfosforilación como un mecanismo de regulación biológica y el establecimiento de la cascada de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Sus hallazgos le merecieron, a los 74 años, junto con Edmond H. Fisher el premio Nobel en Fisiología y Medicina 1992, “por sus descubrimientos en relación a la fosforilación reversible de proteínas como un mecanismo biológico de regulación”.

EG Krebs obtuvo su grado de médico en la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington de St Louis, Missouri (Washington University Medical School), realizó trabajo de postgrado en el laboratorio de los doctores Cori en la misma Universidad. En el laboratorio de los Cori escuchó por primera vez que existen dos formas de fosforilasa: la fosforilasa a, que es activa sin la adición de AMP, y la fosforilasa b que se inactiva sin la adición de AMP. Debido a sus antecedentes en química decidió estudiar la interacción de la protamina con la fosforilasa de músculo de conejo. Le gustó tanto el trabajo que decidió continuar haciendo investigación más que regresar a la práctica médica. Así, la misma Universidad de Washington le ofreció una posición de Profesor Asociado.

Fisher se unió posteriormente como profesor asociado a la Universidad de Washington y allí inició una colaboración larga y productiva con EG Krebs.

Krebs y Fisher se propusieron determinar los mecanismos por los que la fosforilasa b inactiva se convertía en fosforilasa a. Basados en el trabajo de los Cori, creían que un grupo prostético, del tipo del AMP participaba en la activación de la fosforilasa b. Sin embargo, descubrieron que la interconversión de la fosforilasa es el resultado de una reacción de fosforilación-desfosforilación catalizada por enzimas. Trabajo semejante se estaba realizando en el hígado por Earl Sutherland. Este último descubrió al segundo mensajero AMPc y mostró promueve la fosforilación y activación de la fosforilasa. El

mecanismo por el cual el AMPc promueve la fosforilación y la activación de la fosforilasa fue finalmente elucidado cuando Krebs y Fisher descubrieron a la cinasa de la fosforilasa, que es la responsable de fosforilar a la fosforilasa. La cinasa de la fosforilasa está presente en una forma fosforilada muy activa y en la forma desfosforilada menos activa.

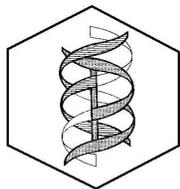
Fisher y Krebs continuaron trabajando en sus áreas específicas relacionadas a la fosforilasa. Uno de los proyectos de Krebs era el estudio de la acción del AMPc en la promoción de la activación de la fosforilasa vía la cinasa de la fosforilasa. Esto fue concretado por un postdoctorante en el laboratorio de Krebs, Donald A Walsh, quien descubrió a la proteína cinasa de pendiente de AMPc o PKA (1). En el músculo de conejo, Krebs, Walsh y Perkins aislaron a una proteína cinasa que activaba a la cinasa de la fosforilasa y que depende del AMPc para su actividad. Debido a que la cinasa catalizaba la fosforilación de otras proteínas, propusieron llamar a la nueva enzima cinasa de la fosforilasa cinasa. El descubrimiento de la PKA estableció la existencia de la primera cascada de cinasas de proteína en las que una cinasa activa a otra cinasa. Esto también estimuló el trabajo sobre el proceso de fosforilación de proteínas en general. Pronto se hizo evidente que la fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo biológico fundamental. Para los años 70 la investigación biológica de la fosforilación de proteínas era tan extensa que constituía el 5% de los artículos publicados en revistas de biología. A consecuencia del significado de su descubrimiento Krebs y Fisher obtuvieron el premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1992.

Durante su segundo periodo de investigación en la Universidad de Washington, EG Krebs se interesó en la fosforilación de los residuos de tirosina en las proteínas y los mecanismos de acción de factores de crecimiento. En 1970 se estableció que las proteínas se pueden fosforilar en tirosina también como en serina y treonina y que las proteína cinasas de tirosina (PTK) frecuentemente actúan como receptores de factores de crecimiento.

Debido a que muchas respuestas celulares a factores de crecimiento, cuyos receptores eran PTK, eran mediados por cambios en la fosforilación Ser/Tre, Krebs quiso saber como la fosforilación en tirosina se acoplaba a la fosforilación Ser/Tre. El abordó el problema trabajando corriente arriba del efecto de los factores de crecimiento en la fosforilación de la proteína S6 ribosomal, que se fosforila en residuos de Ser en respuesta a la activación de receptores PTK. EG Krebs mostró que una cinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPK) estimulada por factores de crecimiento, podía fosforilar y activar a la cinasa S6. MAPK *per se* parecía ser activada por fosforilación en Ser/Tre, lo que sugería la existencia de una tercera proteína cinasa de Ser/Tre en este proceso estimulado por factores de crecimiento. En otro artículo (2), Krebs y su grupo demostraron la existencia de dos factores activadores que catalizan la activación de una

forma inactiva de MAPK. Estos factores resultaron ser las cinasas de MAPK (MAPKK o MEK). Basado en estos trabajos Krebs estableció lo que ahora conocemos como la cascada de MAPK.

1. Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG (1968) An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 243: 3763-3765.
2. Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Diltz CD, Tonks NK, Krebs EG (1991) Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. *In vitro* activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem* 266: 4220-4227.



ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A. C. CONVOCATORIA

Con fundamento en el artículo 35 de los Estatutos Sociales, se convoca a todos los Asociados a la Reunión de Negocios que tendrá verificativo el día 6 de agosto de 2010 en el Auditorio "Jacinto Pallares" en la Facultad de Derecho de la UNAM, en Ciudad Universitaria, Coyoacán, D. F., C. P. 04510. La primera convocatoria será a las 18:00 hrs. y la segunda a las 19:00 hrs. con el siguiente:

ORDEN DEL DÍA

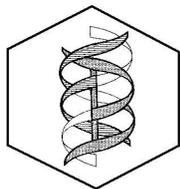
1. Designación de una nueva directiva.
2. Renovación y otorgamiento de poderes.
3. Propuesta de modificación de los Estatutos de la Asociación.
4. Asuntos varios.

Leonor Fernández Rivera-Río
Presidenta
México, D. F. a 30 de marzo de 2010

Debido a que muchas respuestas celulares a factores de crecimiento, cuyos receptores eran PTK, eran mediados por cambios en la fosforilación Ser/Tre, Krebs quiso saber como la fosforilación en tirosina se acoplaba a la fosforilación Ser/Tre. El abordó el problema trabajando corriente arriba del efecto de los factores de crecimiento en la fosforilación de la proteína S6 ribosomal, que se fosforila en residuos de Ser en respuesta a la activación de receptores PTK. EG Krebs mostró que una cinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPK) estimulada por factores de crecimiento, podía fosforilar y activar a la cinasa S6. MAPK *per se* parecía ser activada por fosforilación en Ser/Tre, lo que sugería la existencia de una tercera proteína cinasa de Ser/Tre en este proceso estimulado por factores de crecimiento. En otro artículo (2), Krebs y su grupo demostraron la existencia de dos factores activadores que catalizan la activación de una

forma inactiva de MAPK. Estos factores resultaron ser las cinasas de MAPK (MAPKK o MEK). Basado en estos trabajos Krebs estableció lo que ahora conocemos como la cascada de MAPK.

1. Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG (1968) An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 243: 3763-3765.
2. Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Diltz CD, Tonks NK, Krebs EG (1991) Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. *In vitro* activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem* 266: 4220-4227.



ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A. C. CONVOCATORIA

Con fundamento en el artículo 35 de los Estatutos Sociales, se convoca a todos los Asociados a la Reunión de Negocios que tendrá verificativo el día 6 de agosto de 2010 en el Auditorio "Jacinto Pallares" en la Facultad de Derecho de la UNAM, en Ciudad Universitaria, Coyoacán, D. F., C. P. 04510. La primera convocatoria será a las 18:00 hrs. y la segunda a las 19:00 hrs. con el siguiente:

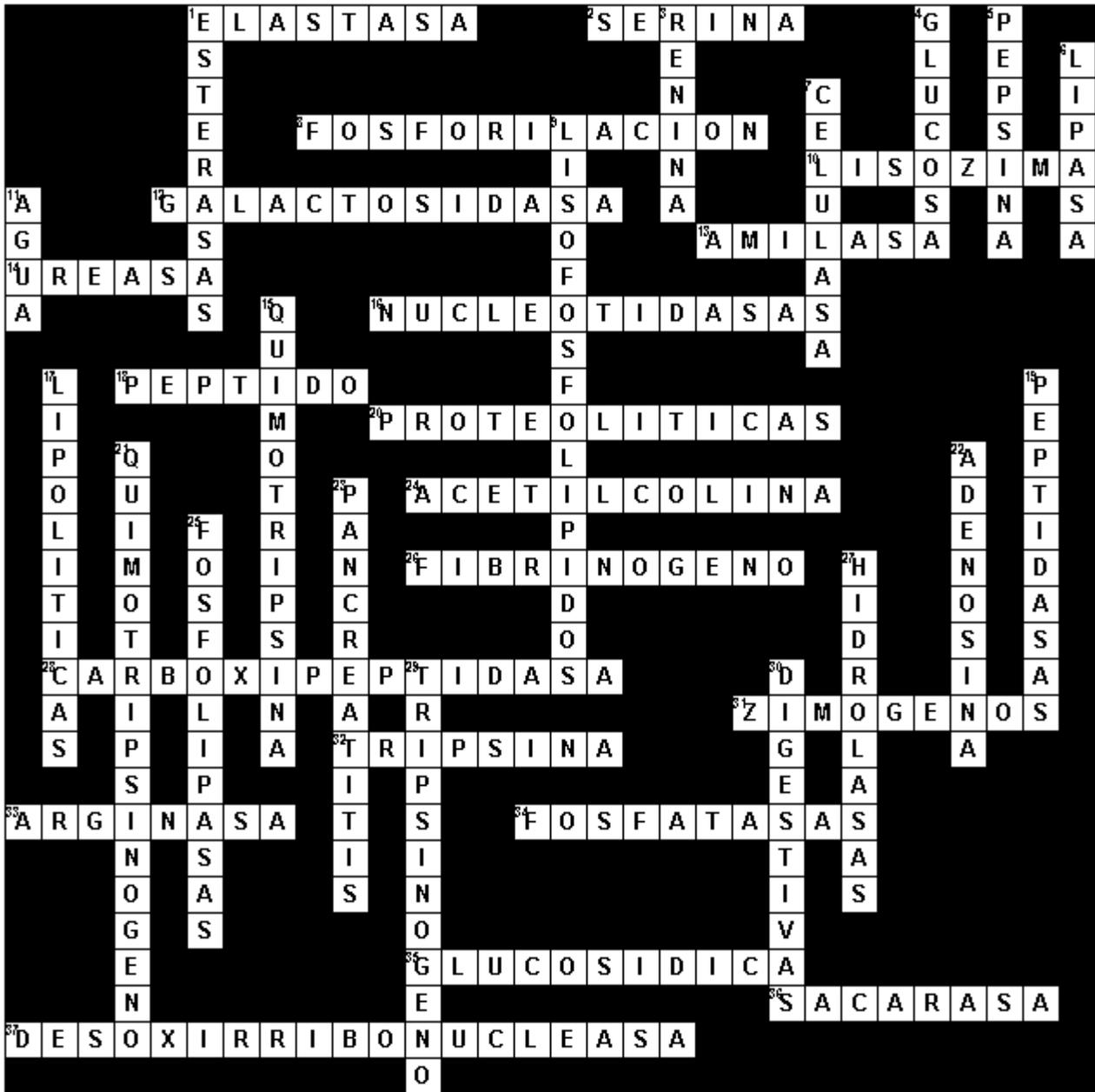
ORDEN DEL DÍA

1. Designación de una nueva directiva.
2. Renovación y otorgamiento de poderes.
3. Propuesta de modificación de los Estatutos de la Asociación.
4. Asuntos varios.

Leonor Fernández Rivera-Río
Presidenta
México, D. F. a 30 de marzo de 2010

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ ENZIMAS: HIDROLASAS

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@laguna.fmedic.unam.mx





1ra. Feria

Latinoamericana de Innovación e Invención en Salud

23 al 26 de marzo 2010

Ciudad Universitaria, México, D.F.

Conferencias Magistrales

Simposia respecto a invención e innovación en salud y principales desafíos

Contactos:
comiteejecutivo@flaiisa2010.com
comiteacademico@flaiisa2010.com
informes@flaiisa2010.com

Talleres: Ciencia, Patentes, Vinculación Academia-Industria-Gobierno

Exposición de prototipos y carteles con los avances tecnológicos en salud

La Facultad de Medicina de la UNAM, la Red de Programas Universitarios de Investigación en Salud en América Latina (Red PUISAL), la Academia de Ciencias de América Latina (ACAL) y la Unión de Universidades de América Latina (UDUAL)

invitan

a miembros de la comunidad universitaria, investigadores, profesionistas, empresarios, técnicos, estudiantes y al público en general interesados en la innovación, el desarrollo tecnológico y la invención en el área de la salud en México y Latinoamérica.

Objetivos

Impulsar la transferencia de conocimientos en el área de la salud para la mejora o creación de procesos, productos y servicios en beneficio de la sociedad.

Identificar y difundir la vinculación educación superior-empresa que permita orientar y motivar a organizaciones en México y Latinoamérica.

www.flaiisa2010.com



INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB)

La REB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y sus áreas afines. La Revista está dirigida a profesores y a estudiantes de licenciatura y de posgrado, por lo cual los trabajos que se sometan para su publicación deberán de ser suficientemente claros y explícitos. Los temas se deben de presentar de forma sencilla, organizada y que de manera gradual permitan la comprensión del trabajo.

Se aceptan contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones que se ajusten a los siguientes lineamientos editoriales:

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 1) Portada. En el primer párrafo incluir el título, el cual debe de ser claro, simple, atractivo y evitar las abreviaturas o, en su caso, definir las al inicio del texto. En el siguiente párrafo se anotarán los nombres completos de los autores, iniciando por el nombre propio completo. La afiliación de los autores se escribirá en el siguiente párrafo, indicando el departamento, la institución, la ciudad y estado, el país y la dirección de correo electrónico del autor responsable. La afiliación de los autores se indicará con números entre paréntesis. Se proporcionará un título breve con un máximo de 60 caracteres.
- 2) Texto. El artículo deberá ser escrito en el procesador de textos "Word", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio, en "Times New Roman 12" como fuente de la letra, sin formato de texto, tabuladores o pies de página. Las figuras y tablas se presentarán separadas del texto.
- 3) Resumen. Se deberán incluir un resumen en idioma español y uno en inglés (Abstract) de no más de diez renglones.
- 4) Palabras clave. Se deberá proporcionar de tres a seis palabras clave en idioma español y en inglés.
- 5) Referencias. Se sugieren no más de 15 citas bibliográficas, tanto específicas como de lecturas recomendadas, lo que obliga a los autores a seleccionar aquellas referencias realmente importantes e informativas. Las referencias se indicarán en el texto con números entre paréntesis de acuerdo a su orden de aparición. Las referencias se enlistarán al final del trabajo y deben contener: apellidos e iniciales de todos los autores, año de publicación entre paréntesis, título completo del artículo y después de un punto, el nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen y antecedido por dos puntos, el número de la primera y última páginas, de acuerdo con el siguiente ejemplo:

Martin GM, Austad SN, Johnson TE (1996) Generic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature gen* 113:25-34.

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood KJ (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The Molecular Biology of Immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Wiley and Sons Ltd, pp 81-104.

Los libros podrán incluir las páginas totales o las consultadas y se citarán de acuerdo con este ejemplo:

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 6) Figuras y Tablas. Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, incluyendo figuras y tablas. Las figuras se pueden presentar en formato "jpg" o integradas en un archivo de "Power Point" o del mismo "Word" separadas del texto del artículo. Las figuras deben de estar en blanco y negro, sin fondo ni sombreados. Las tablas deben de estar en "Word" sin formatos especiales, separadas del texto del artículo. Las figuras y las tablas se deberán numerar con

arábigos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán presentar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja tamaño carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores de dos milímetros. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá darse el crédito correspondiente u obtener el permiso para su publicación. Las figuras dentro del texto deberán mencionarse con minúsculas, la palabra entera y sin paréntesis; cuando se haga referencia a ellas deberá citarse con la abreviatura, la primera letra mayúscula (Fig 2). Las tablas siempre llevarán la primera letra a mayúscula (Tabla 2). Para la versión electrónica de la revista se pueden admitir figuras a color, en tal caso se deberán de enviar ambos formatos en blanco y negro y en color.

- 7) Abreviaturas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán definirse entre paréntesis, la primera vez que se utilicen.

II) OTRAS COMUNICACIONES

- 1) Los temas de las otras comunicaciones pueden ser muy variados; desde resúmenes de artículos científicos interesantes, relevantes o significativos, información científica o académica de interés general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo o comentarios de artículos publicados previamente en la REB, cartas al editor, etcétera.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita en no más de dos páginas.
- 3) Se aceptará un máximo de dos referencias que se incluirán entre paréntesis en el texto, como se indica en el inciso I-5. Se podrá incluir una figura o una tabla, con las características que se indican en el inciso I-6.

Los manuscritos que no cumplan con las especificaciones de la revista no serán aceptados de primera instancia para su revisión. Los manuscritos serán evaluados por tres revisores, quienes opinarán sobre la relevancia del trabajo en un lapso no mayor de dos meses. Las correcciones y sugerencias de los revisores serán enviadas al autor responsable para su corrección e incorporación en el manuscrito. El manuscrito corregido por los autores deberá ser devuelto a la revista, en un lapso no mayor a 30 días; de otra forma se considerará como un manuscrito enviado por primera vez. Una vez aceptado el trabajo, las pruebas de galera, se enviarán al autor responsable.

Los archivos electrónicos se deberán enviar a la Revista de Educación Bioquímica como archivos adjuntos (reb@bq.unam.mx), con atención al Editor en Jefe y a partir de una dirección de correo electrónico que será considerada como la dirección oficial para la comunicación con los autores. El autor responsable deberá identificar plenamente su adscripción con teléfono y dirección postal para comunicaciones posteriores. En el texto del mensaje se debe expresar la solicitud para considerar la posible publicación del artículo, el título del mismo, los nombres completos de los autores y su adscripción institucional, así como el número, tipo y nombre de los archivos electrónicos enviados.