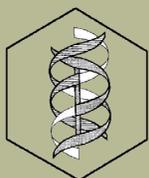


Revista de Educación Bioquímica

REB 2017



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



Asociación Mexicana de
Bioquímicos, A.C.

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNAM

Facultad de Medicina



EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

COMITÉ EDITORIAL

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

EDITORES

RAFAEL CAMACHO CARRANZA

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Medicina, Genómica y Toxicología Ambiental
Universidad Nacional Autónoma de México

ALICIA GAMBOA DE BUEN

Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA

Sección Bioquímica y Farmacología Humana
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA

Instituto Nacional de Pediatría

VÍCTOR M. VALDES LÓPEZ

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

ÁNGEL ZARAIN HERZBERG

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

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

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, Latindex y Scielo.

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), Volumen 36, Número 2, junio de 2017, publicación trimestral, editada por Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., Avenida Universidad No. 3000, Colonia Universidad Nacional Autónoma de México, Delegación Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad de México, México. Correspondencia: Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México. Correo E: reb@bq.unam.mx
<http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/Reb/HomePage>
http://www.facmed.unam.mx/marco/index.php?dir_ver=101
Editor responsable Dr. José Víctor Calderón Salinas. ISSN: 1870-3690. Reserva de derechos al Uso Exclusivo No. 04-2015-113014523300-203, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Diseño: Celia Virginia Sánchez Meza, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en junio del 2017.
El contenido de los artículos y las opiniones expresadas en ellos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente las del Comité Editorial. Se autoriza la reproducción parcial o total de los textos aquí publicados siempre y cuando se cite la fuente completa y la dirección electrónica de la publicación.

CONTENIDO

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

MÁS ALLÁ DE LA SECUENCIACIÓN

Luis David Alcaraz Peraza,
Claudia Segal Kischinevzky,
Viviana Escobar Sánchez,
Luisa Alba Lois y
Víctor Valdés López.....37

ARTÍCULOS

LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA: MECANISMOS DE ENTRADA, TOXICIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO

Elda María del Rocío Coutiño
Lucerito Ávila Lagunes y
Omar Arroyo Helguera.....39

EFFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA EN LA ACTIVIDAD PLAQUETARIA

Jesús Hernández Juárez,
Belem Gallegos,
Eduardo Pérez Campos Mayoral,
Eduardo Pérez Campos,
Socorro Pina y
Pedro Hernández Cruz.....55

OTRAS COMUNICACIONES

CRUCIBIOQ

CICLO DE KREBS

Yolanda Saldaña Balmori.....65

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ

CICLO DE KREBS

Yolanda Saldaña Balmori.....67

INSTRUCCIONES PARA LOS

COLABORADORES DE LA REVISTA DE

EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....68

EDITORIAL

MÁS ALLÁ DE LA SECUENCIACIÓN

El modelo de la estructura tridimensional del DNA propuesto por Watson y Crick en 1953, permitió concebir por un lado cómo es que se transmite la información de generación en generación y por el otro cómo es que esta información se expresa en cada individuo. Ambos aspectos dependen directamente de la secuencia de nucleótidos en los genomas. Por esta razón, era claro que el poder determinar la secuencia de los ácidos nucleicos era un objetivo lógico. Sin embargo la tecnología de la época y durante más de dos décadas tuvo muchas limitantes. De hecho, dado que no era factible secuenciar grandes cantidades de DNA, mucha de la información inicial se obtuvo de "segunda mano" usando los métodos de Fred Sanger para determinar la secuencia de residuos de aminoácidos de las proteínas. A pesar de esto, a cuentagotas se fueron obteniendo secuencias de DNA que, aunque cortas, eran notablemente relevantes. Por ejemplo, las secuencias de algunos promotores bacterianos y del operador Lac, permitieron comenzar a intuir cómo es que ocurren las interacciones DNA-proteína, fundamentales en la regulación de la expresión génica. Sin embargo, la búsqueda del gral, obtener la secuencia de nucleótidos de genes y genomas continuaba.

Finalmente con la llegada de las metodologías de secuenciación desarrolladas por Fred Sanger y su grupo, la meta comenzó a vislumbrarse: Ya era posible secuenciar segmentos relativamente largos de DNA de manera confiable. Aunque estos métodos tenían algunas limitaciones, se puede decir que con el método de Sanger llegamos no sólo a la etapa del gen sino a la etapa genómica, ya que de hecho a finales de los años setenta del siglo pasado se secuenció el primer genoma completo (el de ϕ X174 / 5,375 pares de bases). Aunque el avance fue lento, finalmente en 1995 el grupo de Craig Venter publicó el primer genoma de una bacteria de vida libre, *Hemophilus influenzae*, de 1.8 Mb (mega pares de bases = un millón de pares de bases). A este primer genoma se unieron muchos otros y en 2001 se publicaron los primeros borradores del genoma humano. Los esfuerzos por alcanzar este logro habían comenzado muchos años antes y fueron largos y tortuosos. Por ejemplo, el grupo Celera utilizó 200 secuenciadores "automáticos", que trabajaron las 24 horas durante tres años y completaron la secuencia de cada uno de los

cromosomas humanos. Esto fue más del doble del tiempo de lo que le tomó al consorcio público concluir su trabajo.

Los avances continuaron y llegaron los protocolos llamados de segunda generación (NGS, Next Generation Sequencing), que permitieron obtener millones de nucleótidos secuenciados en cuestión de horas y además los costos se disminuyeron de manera muy importante. Por supuesto, estos métodos aumentaron exponencialmente el número de secuencias reportadas, por lo que también fue necesario que la bioinformática avanzara en paralelo. Y surgió la metagenómica, que pretende identificar organismos no cultivables en el laboratorio que son la mayor parte de la población presente en cualquier ecosistema. A pesar de esto, en realidad la cantidad de genomas secuenciados sigue siendo una pequeña fracción del número de especies, sobre todo unicelulares, que se estima que existen. Para la segunda década de este siglo llegó la secuenciación de tercera generación, que permite secuenciar de manera corrida hasta 100, 000 pares de bases. Dicho de otro modo, la secuenciación ya no es una limitante.

¿Y ahora qué sigue?

Actualmente hemos progresado de tan solo leer a comenzar a escribir el DNA. La síntesis de DNA no es nueva, la síntesis química de oligonucleótidos lleva bastante tiempo en escena. Sin embargo, en la actualidad ya somos capaces de sintetizar DNA en escala de genomas. El mismo Venter, cuyo desarrollo de la secuenciación por fragmentos (shotgun) y el consecuente ensamblado genómico de fragmentos aceleró vertiginosamente la posibilidad de secuenciar genomas, ahora habla de que el visualiza a los genomas como un software o más bien como el sistema operativo de una célula y se ha lanzado a las primeras incursiones del cómo hacer un sistema operativo biológico mediante la síntesis de un genoma mínimo. Si bien tomó como base a los ya reducidos genomas bacterianos del género *Mycoplasma*, fue capaz de tener una estrategia sistematizada para el diseño, síntesis química, ensamblado y trasplante del genoma.

La idea del genoma mínimo es atractiva desde múltiples aristas. Desde la genómica comparativa, la idea de un genoma mínimo lleva a preguntas

fundamentales, por ejemplo: ¿Qué genes son los conservados en un grupo biológico? ¿Qué mantiene la coherencia de un género, de una especie, a nivel molecular? Para este tipo de preguntas las respuestas tentativas provienen de múltiples disciplinas previas a las ómicas, tales como la genética clásica, la bioquímica, la biología molecular y en eras recientes, la genómica funcional. Éstas nos han proporcionado las herramientas para comenzar a entender la función de los genes.

Resulta curioso que hemos superado una limitante clásica de nuestro proceso de comprensión y ya es rutinario secuenciar genomas bajo la menor provocación y que podemos hacerlo en casi cualquier laboratorio. Sin embargo, la velocidad a la que se hacen los experimentos gen por gen no avanza a la velocidad de la secuenciación. Desde que Jacques Monod, François Jacob y Andre Lwoff, galardonados en 1965 con el premio Nobel por su trabajo de regulación genética, descubrieron los operones en la bacteria *Escherichia coli*, describieron principios aplicables a toda la vida; se esperaría que en 2017 ya fuéramos capaces de integrar un modelo donde a partir del genoma de *E. coli* pudiéramos predecir su fisiología, metabolismo, función y regulación de sus genes. Intentos hay varios, pero estamos limitados al universo de los genes cuya función ya está descrita y aún nos falta trayecto por recorrer.

Se calcula que en el genoma de *E. coli* se codifican alrededor de 4,140 proteínas. De estas, aún quedan 147 proteínas predichas que no están bien caracterizadas. Un segundo modelo bacteriano bien estudiado es, sin duda, *Bacillus subtilis*. En este genoma se ubican alrededor de 4,260 genes que codifican para proteínas, de las cuales 847 son hipotéticas. Hipotéticas es el eufemismo para disimular el hecho de que no tenemos mucha idea de para qué sirven. Otras 231 son hipotéticas sin ninguna secuencia homóloga en las bases de datos. Así, no tenemos idea de un 19.88% de las funciones de los genes de uno de los organismos mejor estudiados en la historia. El panorama no mejora cuando nos movemos fuera de los organismos modelo. Con las herramientas de genética y genómica disponibles, no es difícil encontrar un 30% de genes sin parecido a nada en las bases de datos de genes y proteínas por cada genoma bacteriano nuevo secuenciado. Inclusive en el genoma "sintético" del *Mycoplasma de Venter*, con tan solo 473 genes, se incluyen 79 genes que codifican proteínas (16.70% del genoma) de los cuales no se tienen evidencia de sus funciones moleculares fuera de que son esenciales para la célula y mejor tenerlos incluidos en el genoma sintético.

La secuenciación va dejando de ser un problema y ya hay múltiples tecnologías maduras para secuenciar miles de genomas de cualquier tamaño

de forma casi rutinaria y asequible. El futuro después de la secuenciación de próxima generación y de tercera generación será poner a punto las estrategias de genómica funcional automatizadas y de alto desempeño (high throughput); sintetizar de forma automática los genes que deseamos estudiar; lograr generar mutantes de pérdida y ganancia de función mediante sistemas de edición genómica (i.e. CRISPR-Cas9); evaluar fenotipos con sistemas de monitoreo automático; analizar transcriptomas en múltiples condiciones; mejorar sistemas de expresión de proteínas, interacciones DNA-proteína, proteína-proteína, etc. Se han hecho avances significativos en temas de automatización, pero todavía seguimos dependiendo de técnicas y habilidades clásicas de genética, biología molecular y bioquímica para entender las funciones moleculares codificadas en los genomas. Quizá de la mano de la automatización de procesos de tareas del laboratorio se podría pensar en la siguiente generación y quizá hablar del next generation phenotype. La tarea pendiente es enorme, pero nos permitirá aventurarnos a tratar de recorrer el camino desde el genoma hasta el fenotipo y seguir intentando modelar de forma global el funcionamiento de células, poblaciones, comunidades y ecosistemas. Desde un punto de vista muy general, un genoma es un conjunto de genes. La genómica evolutiva permite relacionar genomas donde el repertorio es parecido pero no idéntico (además de que el orden puede cambiar entre genomas a veces muy relacionados). Las pérdidas y ganancias de regiones genómicas son sumamente comunes y seguramente juegan un papel importante en la diferenciación filogenética.

Vamos, hay mucha vida y trabajo por delante del post next generation sequencing. Es una época emocionante para trabajar donde la genética, la biología molecular y la bioquímica tradicionales siguen siendo el fundamento y donde no debemos de perder a las preguntas biológicas fundamentales como los actores principales, auxiliadas por todo el desarrollo tecnológico asociado.

Luis David Alcaraz Peraza

Claudia Segal Kischinevzky

Viviana Escobar Sánchez

Luisa Alba Lois

Víctor Valdés López

Laboratorio de Biología Molecular y Genómica.

Departamento de Biología Celular.

Facultad de Ciencias.

Universidad Nacional Autónoma de México.

LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA: MECANISMOS DE ENTRADA, TOXICIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO*

Elda María del Rocío Coutiño^{1,2}, Lucerito Ávila Lagunes³, Omar Arroyo Helguera¹

¹Instituto de Salud Pública Universidad Veracruzana, Ave. Luis Castelazo S/N CP 91190; ²Facultad de Biología, Lomas del Estadio S/N Universidad Veracruzana; ³SESSVER Unidad Inteligencia Epidemiológica Calle Ernesto Medina 3 CP 91120. Xalapa, Veracruz México, Correo E: ecoutino@uv.mx; coutinoe@gmail.com

RESUMEN

En las últimas décadas, el estudio y la aplicación de los coloides y las nanopartículas (NPs) se ha extendido notablemente en la industria y particularmente en la medicina, desarrollando la era de la nanotecnología, con gran relevancia por su biodisponibilidad y sus efectos microbianos. Sin embargo, las propiedades inherentes de las NPs, especialmente las hechas a partir de metales como la plata (AgNPs), tienen implicaciones en la salud de las poblaciones, lo cual se evidencia al analizarlas desde la perspectiva de sus características, entre ellas, el tamaño, vías de exposición, mecanismos de entrada y principalmente, sus afectaciones en el transporte de electrones debido a su afinidad con la ubiquinona, así como en la inducción del estrés oxidativo y sus efectos tóxicos (necróticos y apoptóticos) e inmunotóxicos. Especialmente, analizando por una parte el papel del blanco principal de las AgNPs, la ubiquinona, en la inducción en los marcadores del estrés oxidativo, como la hemo-oxigenasa 1 y los 8 isoprostanos, moléculas involucradas con casi todas las enfermedades crónico-degenerativas, y por otra el papel reductor de los iones sobre las uniones disulfuro y la desestabilización de las proteínas.

ABSTRACT

In the last few decades, the study and application of colloids and nanoparticles (NPs) has spread notably in industry and particularly in medicine, developing the era of nanotechnology, with great relevance for its bioavailability and microbial effects. However, the inherent properties of NPs, especially those made from metals such as silver (AgNPs), have implications for the health of populations, which is evidenced when analyzing them from the perspective of their characteristics, among them, the Size, pathways of exposure, mechanisms of entry and, mainly, their effects on electron transport due to its affinity with ubiquinone, as well as the induction of oxidative stress, and its toxic effects (necrotic and apoptotic) and immunotoxic. Particularly, analyzing on the one hand the role of the main target of AgNPs, ubiquinone, in inducing oxidative stress markers such as hemo-oxygenase 1 and 8 isoprostanos, molecules involved with almost all chronic-degenerative diseases, And on the other the role of reducing ions on disulfide bonds and the destabilization of proteins.

INTRODUCCIÓN

El auge de las nanopartículas (NPs) se debe a su tamaño, forma, estado de aglomeración, área y carga superficial, lo que les permite ser más solubles, así como tener una mejor difusión, distribución,

absorción y disponibilidad, registrándose un apogeo en sus usos, sobre todo en el caso de las nanopartículas de plata (AgNPs), a las que se ha atribuido muchos beneficios en la medicina enfocados, principalmente, en las enfermedades infecciosas y en el diagnóstico y tratamiento del cáncer (1, 2).

PALABRAS CLAVE:

Nanopartículas de plata, ubiquinona, estrés oxidativo, toxicidad, hemo-oxigenasa 1 y 8 isoprostanos.

KEY WORDS:

Silver nanoparticles, ubiquinone, oxidative stress, toxicity, hemo-oxygenase 1 and 8 isoprostanos.

Las AgNPs son partículas microscópicas suspendidas en líquido, a través de un estímulo eléctrico positivo, o bien, de forma pura la plata se encuentra suspendida en agua desionizada; su tamaño oscila entre 1 nm y 100 nm aproximadamente. En este proceso, la plata (Ag) generalmente queda con carga positiva iónica (Ag^+). Actualmente, se utiliza numerosos compuestos para estabilizar la carga y el tamaño de las AgNPs, de los cuales dependerá su actividad y toxicidad (3-7).

Los coloides de plata (Pc) están comprendidos dentro de las AgNPs y son partículas pequeñas suspendidas en un líquido, sin perder sus propiedades individuales. Las presentaciones de los Pc abarcan partículas de 15 átomos o menos de plata pura, (NPs) extremadamente pequeñas, ionizadas con carga eléctrica positiva y estabilizadas a base de proteínas como la albúmina o la gelatina vegetal en la Pc comercial utilizada como desinfectante por su gran actividad antimicrobiana. Sin embargo, en calidad de coloide se ha propuesto que puede comportarse como un antígeno xenobiótico y disruptor hormonal alterando los mecanismos de defensa y hormonales; por lo tanto, representa un riesgo para la salud, además de los efectos inmunotóxicos y genotóxicos que tenga (8). Estos efectos tóxicos dependen no solo de las propiedades inherentes de las AgNPs, sino que están asociados con las vías de exposición, así como con los mecanismos de absorción, transporte, distribución y entrada en las células.

Efectos antimicrobianos de las AgNPs

El auge en el uso de las AgNPs se debe a su potente actividad microbicida y a las ventajas conferidas a ellas tanto por su tamaño como por su facilidad para entrar a las células, transitar a través de vasos sanguíneos, traspasar la barrera hematoencefálica y alcanzar sitios donde los compuestos convencionales no llegan. Sin embargo, esta particularidad debe ser manejada con cuidado debido a los posibles efectos tóxicos que conlleva y que se analizará a lo largo del trabajo.

El uso de la Pc comercial en México se popularizó a partir de los noventa, por su fuerte actividad antimicrobiana y desinfectante (5). Existen varias presentaciones comerciales (Biopur, Mycrodyn, Silverdin, Cromin, entre otras) no obstante, la actividad microbicida se limita al grado de contaminación en las muestras. Trabajos anteriores realizados en 2004 demostraron que el solo lavado previo de las lechugas reduce el número de bacterias de igual manera que al emplear Pc en cualquier presentación en muestras no lavadas. La efectividad en la reducción bacteriana aumentó en

muestras previamente lavadas (9), por lo tanto, su uso debe evaluarse en función del costo-beneficio por sus repercusiones en la salud.

Las AgNPs tienen un gran efecto microbicida en bacterias Gram negativas y positivas, e incluso inhiben la etapa de fusión del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en la célula y con ello evitan la infección en los cultivos celulares (5, 10, 11).

Mecanismos antimicrobianos y tóxicos de las AgNPs

La acción microbicida y el resultado tóxico de las nanopartículas de plata se deben a su actuación como metal, ion o NPs (7). Su efecto antimicrobiano se relaciona con varios procesos biológicos, entre ellos, la generación de especies de oxígeno reactivas (EROS) y la inducción de estrés oxidativo (EO), por el desacoplamiento del transporte de electrones y la desactivación de enzimas, particularmente a causa de la desnaturalización de los enlaces disulfuro de las proteínas bacterianas, que conduce a la muerte celular (5, 12-16).

En las bacterias, como en las células eucariotas, el blanco principal para su toxicidad es la alteración de la pared celular y de la membrana celular bacteriana, inhibiendo los procesos de respiración e interactuando con el azufre que contiene la membrana bacteriana y con los grupos fosfatos del DNA. Así, se impide la replicación y se inactiva la enzima fosfo-manosa isomerasa encargada de catalizar la conversión de manosa-6-fosfato a fructuosa-6-fosfato, intermediario de la glucólisis, por una vía común en bacterias para llevar a cabo el catabolismo de azúcar (17-19).

No obstante, el mecanismo detonante de la toxicidad en las bacterias se debe a su interferencia con la ubiquinona o coenzima Q que en la mitocondria participa en el proceso respiratorio (20). La coenzima Q en las membranas, tiene una función antioxidante, de forma directa, contra la formación de lipoperóxidos o de manera indirecta, a través del reciclado de otros antioxidantes lipídicos como la vitamina D. La consecuencia del efecto de la Ag^+ sobre la ubiquinona es el desacoplamiento del transporte iónico de sodio y potasio entre otros, de ahí su gran toxicidad y afectación, principalmente en el nivel del sistema nervioso.

No es fortuito que la toxicidad, en la mayoría de los modelos celulares de las eucariotas, esté relacionada con los efectos y la toxicidad en la mitocondria, a causa del posible origen endosimbótico de este organelo a partir de bacterias.

En la mitocondria ocurre el transporte de electrones y es el sitio donde se generan las EROS y

el EO durante la respiración oxidativa. Asimismo, se transfieren cuatro electrones que originan productos naturales como oxígeno, agua y ATP. Con la participación de las flavoproteínas, se capta dos electrones y dos protones (H^+), los citocromos transfieren un electrón, la ubiquinona transfiere tanto dos electrones como dos protones y una proteína hierro-azufre transfiere un electrón, evento acoplado con la succinato deshidrogenasa del ciclo de Krebs ligada a la membrana externa de la mitocondria, capaz de transferir un electrón a la ubiquinona -aquí se puede desacoplar el transporte de electrones por parte de la Ag^+ - y ésta, de transferir dos electrones al ubiquinol y a la citocromo c reductasa.

Si en la cadena de electrones solo se transfiere un electrón, se forman EROS como el ion superóxido que, con la superóxido dismutasa, produce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ion hidroxilo, generando el EO asociado con los efectos citotóxicos acoplados de las AgNPS.

- La plata inhibe la actividad de la ubiquinona-10, reguladora del transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y también de la bomba sodio-potasio en membranas celulares.
- Particularmente, pertenece al Complejo I la NADH deshidrogenasa o NADH ubiquinona oxidoreductasa, que capta dos electrones del NADH y los transfiere a un transportador liposoluble denominado ubiquinona (Q). El producto reducido, que se conoce con el nombre de ubiquinol (QH_2), se puede difundir libremente por la membrana. Al mismo tiempo, el Complejo I traslada cuatro protones a través de la membrana, produciendo un gradiente de protones.
- La toxicidad de las AgNPS se asocia con el estrés oxidativo (20).

Toxicidad de las AgNPs en los organismos

El efecto tóxico de las AgNPs se ha demostrado en diversos modelos de estudio (*in vitro* e *in vivo*), más complejos y en organismos completos (1, 21-25). La toxicidad está vinculada con las vías de exposición, absorción, transporte, distribución y acumulación en los organismos, así como con los mecanismos de entrada en el nivel celular.

Vías de exposición, de absorción y mecanismos de entrada celulares

A pesar de que se ha estudiado los efectos tóxicos de las AgNPs en los organismos, se desconoce los mecanismos precisos de su entrada, el lugar

exacto de bioacumulación, su metabolismo celular y la manera en que el cuerpo los elimina. En este sentido, estudios efectuados en ratones y ratas han demostrado que las AgNPs, independientemente de la vía de exposición y absorción -inhalada, dérmica u oral-, logran entrar a la circulación sanguínea, acumularse en macrófagos y distribuirse sistémicamente llegando a diversos órganos y afectándolos. Dañan principalmente el hígado, riñón, corazón y bazo e incluso el cerebro y la piel (25). La afectación depende de la vía de exposición.

En humanos, la exposición a las AgNPs tiene lugar primordialmente por medio de los alimentos, del aire y del contacto por la piel (Fig. 1). Estas formas, asociadas con las correspondientes vías de absorción, -respiratoria, oral, y dérmica- son las más relevantes, aunque otras están aumentando en importancia, por ejemplo, a través del tracto genital femenino, debido a la incorporación de AgNPs, en la higiene materna, etcétera (1, 26-28).

Los efectos tóxicos causados por las distintas exposiciones dependen de la vía de absorción.

Vía respiratoria

Los efectos más sobresalientes se dan por la vía de exposición inhalatoria y la absorción pulmonar. La inhalación de partículas ultrafinas, como las AgNPs, provenientes de procesos industriales, areosoles entre otros, está relacionada con efectos pulmonares y cardiovasculares severos, incremento del pulso cardiaco, disminución en la oxigenación capilar, silbidos al respirar, estornudos frecuentes, falta de aire, flujo nasal, dolor de garganta, presión en el pecho y hasta procesos inflamatorios crónicos severos como efisema (29).

Tras la inhalación, las AgNPs se depositan en la cavidad nasal, la región alveolar y los ganglios linfáticos de los pulmones, generando una respuesta inflamatoria, de modo que la fagocitosis de estas partículas conduce a la activación de macrófagos alveolares y a la liberación de quimiocinas, citoquinas, EROS entre otros mediadores de inflamación (31). La eliminación de las AgNPs o de cualquier NP por la vía pulmonar se hace, generalmente, a través del sistema mucociliar y del sistema linfático, pero también a partir de la disolución de las NPs para incorporarse al torrente sanguíneo y por la vía sistémica. Pueden, de igual modo, terminar en el tracto digestivo y se sigue los mecanismos de distribución y eliminación propios de la vía oral.

Por tanto, después de la inhalación de AgNPs además de que se acumulan en pulmón pueden liberarse y pasar a la vía sistémica y localizarse en otros órganos como riñones, páncreas, corazón,

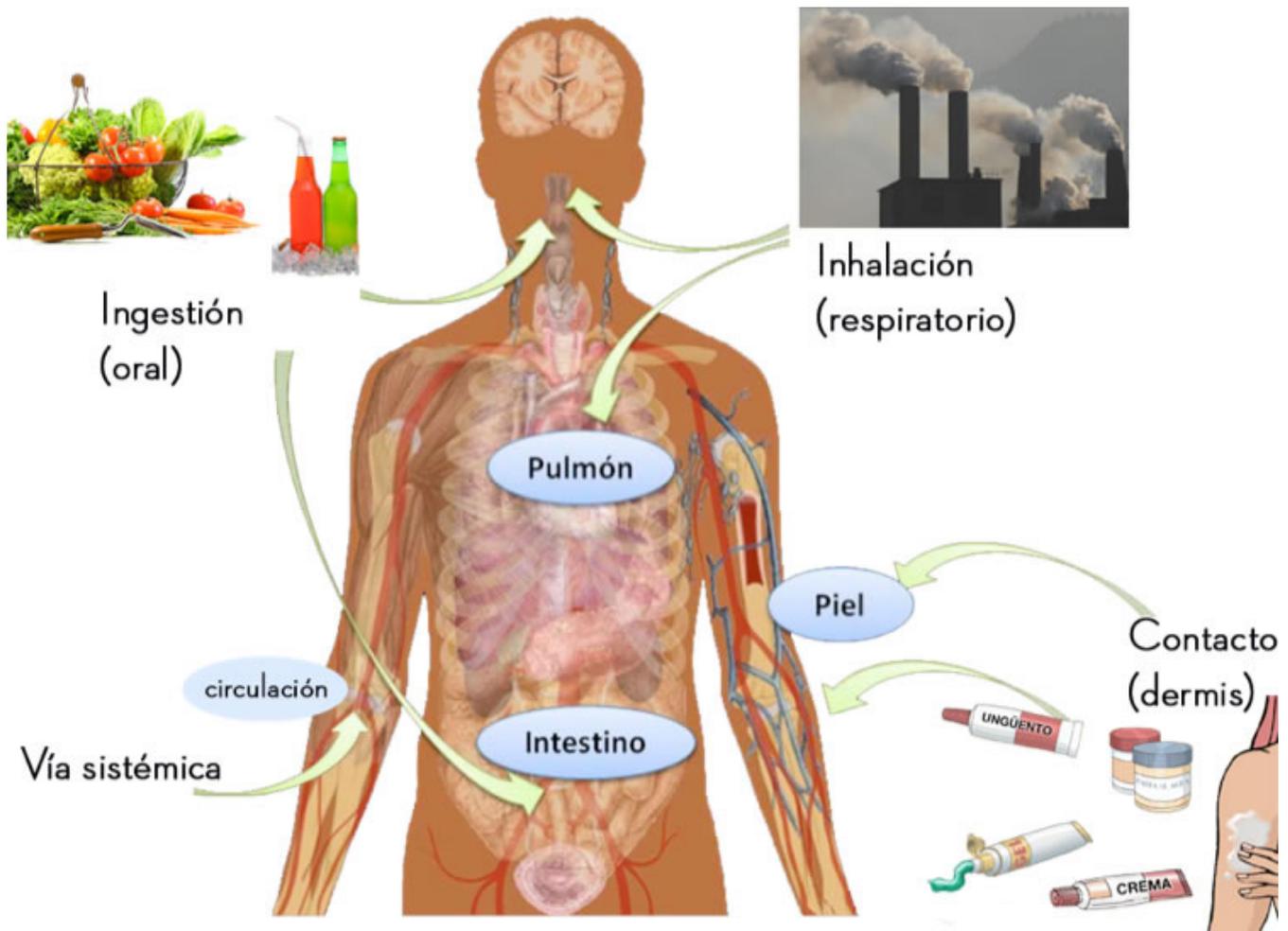


Figura 1. Principales vías de exposición y absorción de AgNPs. Elaborado a partir de la referencia (1).

bulbo olfatorio y cerebro participando en procesos inflamatorios y cáncer (29-31).

Vía oral

La ingestión de NPs, entre ellas las AgNPs, está relacionada con daños severos en el tracto gastrointestinal como las úlceras intestinales, además de argiria y afectación al hígado y al riñón. Posiblemente, el pH del estómago favorezca su incorporación al torrente sanguíneo así, pasan a la vía sistémica y se distribuyen en todos los órganos.

La absorción en el nivel gastrointestinal genera dolor abdominal y efectos renales notorios en el aspecto bioquímico, como disminución de la creatinina y el incremento en la excreción de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa en orina, en tanto que en la sangre aumenta la hemoglobina y se reducen las células rojas. En el nivel ocular, causa granularis en la conjuntiva y en la córnea, además de argiriosis que provoca baja en la visión nocturna.

Asimismo, la absorción por la vía oral se asocia con la acumulación de granos de plata en la piel que ocasionan argiria y argiriosis en riñones, cerebro, pulmones y testículos (20, 25, 32) y causan severos daños en el hígado al acumularse en macrófagos del sistema reticuloendotelial y en los queratocitos de la piel, principales responsables de eliminar las AgNPs.

Vía dérmica

La vía de exposición dérmica es muy controvertida ya que, a pesar de que el estrato de la capa córnea de la epidermis es una barrera muy fuerte que le confiere una limitada penetración de partículas, los productos textiles y apósitos que contienen derivados de AgNPs permiten que entren en contacto directo con la piel y se ha visto, tras la exposición a ellos, la producción de argiria.

Existen evidencias de su penetración transdermal a través de la piel intacta además, la fagocitosis

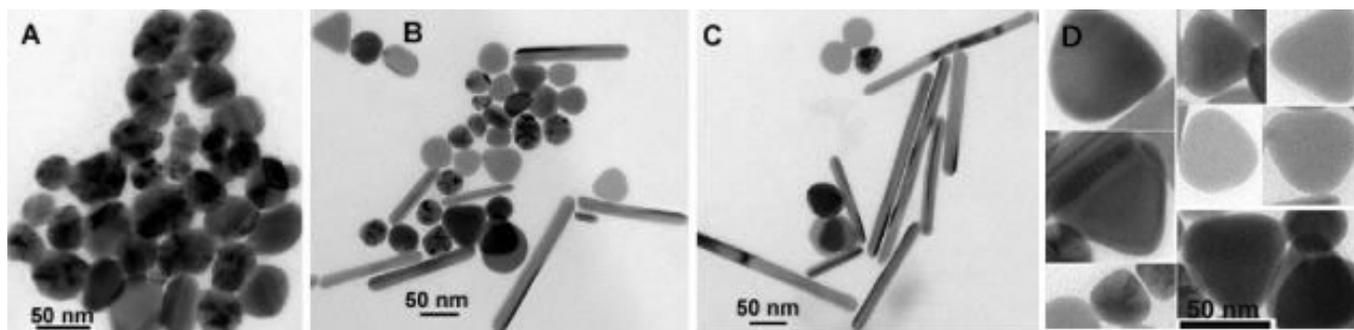


Figura 2. Diferentes formas de las AgNPs de imágenes de microscopía electrónica de transmisión y de energía filtrada (TEM) y (FETEM). (A) Nanopartículas esféricas sintetizadas por reducción del citrato. (B) Nanopartículas de diferentes formas. (C) nanopartículas purificadas en forma de barilla D) Partículas truncadas purificadas tomada de la referencia (40).

de las NPs por los queratinocitos desencadena una respuesta inflamatoria (33) Igualmente, se ha observado un aumento de las enzimas hepáticas que sugiere daño al hígado por el tratamiento, lo que pone en evidencia que también mediante la vía dérmica se alcanza la vía sistémica (34), aunque aún no está del todo claro cómo atraviesan las AgNPs el estrato córneo y llegan a la circulación sistémica.

Por otro lado, se ha detectado, por efecto de las AgNPs, alteraciones en las células somáticas del testículo (espermatogénesis), causando toxicidad en células madre de la línea germinal *in vitro*, lo que conduce a la esterilidad (21, 35). De la misma forma, inducen el desarrollo de tumores y afectan la respuesta inmune, de tal manera que la exposición dérmica está más asociada con alergias y dermatitis.

Otros efectos reportados en estudios selectivos y específicos realizados con las células endoteliales, han demostrado que las AgNPs actúan de dos formas: a bajas concentraciones actúan como factores anti proliferativos/vasoconstricción, es decir perjudican la producción de óxido nítrico (NO), y a altas concentraciones estimulan la proliferación/vasorrelajación mediada por la producción del NO, lo que indica que de acuerdo a la concentración será el efecto tóxico, así como el tener otros efectos fisicoquímicos (36).

Independientemente de la vía de exposición, los compuestos de plata como las AgNPs y los Pc alcanzan la circulación sanguínea y se distribuyen sistémicamente, por tanto, los efectos son prácticamente los mismos o semejantes a los reportados para cualquiera de las vías -inhalatoria, oral o dérmica- los cuales dependerán de la concentración, tiempo de exposición y de otros factores inherentes a las AgNPs, siendo el hígado el órgano blanco más afectado (1).

Factores intrínsecos de las AgNPs involucrados en la toxicidad

Los efectos tóxicos de la exposición a las AgNPs se deben a su tamaño, ya que esto ayuda a la distribución celular y a la penetración dermal e intestinal.

Las formas más tóxicas se han observado con las AgNPs más pequeñas y con el aumento de la superficie específica. El tamaño y la superficie específica están relacionados estrechamente. Al disminuir el primero, la segunda incrementa dejando un mayor número de átomos expuestos superficialmente que estarán disponibles para las reacciones redox, reacciones fotoquímicas, interacciones fisicoquímicas con las células y para fomentar la aglomeración o la liberación del material, como cuando se liberan los iones de plata (Ag^+) que son potencialmente las formas más tóxicas (1, 37, 38) Por lo tanto, los efectos tóxicos de las AgNPs, en bacterias y microorganismos, dependerán de la forma iónica o metálica y del tamaño o los aglomerados formados (1, 7, 39).

Algunos reportes demuestran que el área superficial de las NPs influye en la producción de EROS pues, a la misma concentración, las AgNPs de 15 nm produjeron mayores niveles de EROS en macrófagos que las de 50 nm (39).

Otro factor implicado en la toxicidad es la forma de las AgNPs (Fig 2), las de triángulo truncado son las más tóxicas que las de las formas esféricas y alargadas, en este aspecto el contenido de caras parece participar (40). Posiblemente, las truncadas activen varios mecanismos de señalización porque interactúan con varios receptores, mientras que las esféricas entran por pinocitosis disminuyendo el efecto.

La estabilidad de las AgNPs también influye en la toxicidad. Éstas tienden naturalmente a formar aglomerados y agregados que pueden tener menor

área superficial y, por tanto, ser menos tóxicos (1, 41).

Del mismo modo, la carga superficial de las AgNPs es otro factor en la toxicidad. Las estabilizadas por medio de citrato, con cargas negativas, son menos tóxicas que las AgNPs con cargas superficiales positivas estabilizadas con polietilamina ramificada; igualmente, aquellas estabilizadas que no presentan carga son aún menos tóxicas.

Finalmente, las propiedades toxicológicas propias y específicas de las AgNPs también se afectan por otros factores inherentes a éstas o a los fluidos biológicos, como su solubilidad, pH y concentración de sales. Al disolverse, pierden dichas propiedades, pues disueltas y libres siguen consideraciones toxicológicas semejantes a otros contaminantes, como los fármacos o xenobióticos, con efectos sistémicos. No obstante, la liberación de Ag^+ a partir de AgNPs aún es difícil de interpretar y más aún la toxicidad, ya que no está del todo claro si ésta se debe a la forma de AgNP o a los Ag^+ , y no se conoce mucho sobre su liberación ni sobre el paso de Ag^+ a metálica Ag^0 por efectos oxidorreductores, como cambios en el pH que favorezcan su absorción, distribución, bioacumulación, neutralización o eliminación.

Efectos citotóxicos en modelos eucariotes

Los daños van desde cambios en la viabilidad celular hasta toxicidad celular de tipo necrótico y apoptótico, genotoxicidad, inmunotoxicidad, entre otros. La toxicidad de las AgNPs, en los distintos modelos eucariotes experimentales *in vitro* e *in vivo*, es muy semejante a la encontrada en las bacterias, lo que depende del diámetro y tamaño de las NPs, estabilización, carga iónica y concentración, asociados con su solubilidad y con los mecanismos de entrada (5, 12, 21, 39, 44-51).

Los mecanismos de entrada en las células eucariotas

Si consideramos la célula como la unidad principal de la vida que realiza los procesos biológicos de cualquier ser vivo, las NPs como las AgNPs podrían seguir los mismos mecanismos que las vías inhalatoria, oral y dérmica de los organismos.

La vía oral en el nivel celular correspondería a la endocitosis y la pinocitosis, donde las vesículas alcanzan los lisosomas que actúan de forma semejante al sistema digestivo. La difusión pasiva sería la vía inhalatoria, que concerniría a la respiratoria, y por este medio se llegaría a la mitocondria, donde se llevan a cabo los procesos respiratorios celulares. La vía dérmica en los organismos, es un

mecanismo poco claro y en la célula no se puede hablar como tal, no hay información acerca de que en la célula ocurra un proceso semejante, no obstante, la entrada de manera inespecífica por difusión pasiva por toda la membrana plasmática semejante a la absorción por piel y, en todos los casos, alcanzarían al sistema de endomembranas internas, que correspondería a la vía sistémica, encargada de distribuir y transportar las partículas o NPs a los distintos organelos membranosos y eventualmente arribar al núcleo.

Sin embargo, los factores implicados en los mecanismos de entrada de las NPs no son exclusivos de éstas, sino que son aplicables a todos los compuestos químicos. Así, dependiendo de la carga, tamaño, carga superficial, presión atmosférica, solubilidad, superficie específica y su aglomeración o agregación con material orgánico, o bien, con proteínas transportadoras, será su mecanismo de entrada en los organismos e internalización en el nivel celular y, por lo tanto, sus efectos, que también dependerán de la concentración, el tiempo de exposición, la afinidad a las células, el estado de la célula y el momento en que éstas se encuentran, es decir, la fase del ciclo celular.

Aquí, sin duda, cualquiera de los mecanismos propuestos de entrada de las AgNPs involucra a la membrana, uno de los más importantes es la difusión, que ocurre con las NPs más pequeñas y los iones metálicos sin carga, y el efecto dependerá de la concentración. Las partículas se distribuirán por todo el sistema de endomembranas, alcanzando las mitocondrias, los lisosomas y eventualmente el núcleo. Tales organelos celulares son, precisamente, los que acumulan más NPs y por lo tanto, éstas resultan más tóxicas, debido al EO producido principalmente por el daño a la mitocondria, responsable del estrés oxidativo de la citotoxicidad apoptótica (22, 23, 29, 39, 42, 43).

Por otra parte, el rango de escala de 1-100 nm es muy importante para las interfaces biológicas, ya que objetos menores de 12 nm de diámetro pueden atravesar la barrera hematoencefálica, objetos menores de 30 nm pueden entrar por endocitosis y los de ambos rangos lo hacen por pinocitosis (24). Además, también las NPs o moléculas más grandes y a concentraciones más altas entrarían por este mecanismo y lo mismo sucede si presentan afinidad con receptores, debido a la endocitosis mediada por receptores, es decir, por vesículas pinocíticas y endocíticas, que eventualmente alcanzan los lisosomas responsables de la lisis celular o muerte necrótica.

Se ha documentado suficientemente la citotoxicidad apoptótica y necrótica por efecto de las AgNPs, lo que sugiere que tanto las mitocondrias

como los lisosomas se ven afectados sugiriendo que el tamaño, no es homogéneo o bien, depende de la concentración.

Finalmente, otro mecanismo de entrada, para el caso de la forma libre o iónica de la plata, son los canales o bombas, desacoplando y afectando tanto el transporte de electrones como la conductividad eléctrica; por ello, la alta toxicidad de Ag^+ se daría por la liberación de éstos de las AgNPs. Existe aún controversia acerca de si las AgNPs o la Ag^+ son responsables de los efectos citotóxicos; sin embargo, esto depende de la liberación de los iones y se asocia quizás con los microambientes celulares. Algunos autores proponen que la toxicidad es la misma para ambas formas, pero otros han demostrado que la forma iónica es la más tóxica (44).

Efectos tóxicos y mecanismo de toxicidad de las AgNPs

Membrana celular

El blanco principal e inicial para desencadenar un efecto tóxico, por cualquier compuesto incluyendo las AgNPs, son las membranas celulares y el daño depende de los factores intrínsecos de éstas como el tamaño, (1, 37, 45, 46), siendo las partículas más pequeñas de las AgNPs las formas más activas que causan el daño celular más severo, al igual que la forma iónica de la Ag, debido a que presentan una mayor difusión, disponibilidad y distribución, favorecidas por su solubilidad y afinidad a proteínas, entre ellas la albúmina, las metalotioneínas y las metaloproteasas (1, 24, 47-49), encargadas del transporte e inactivación de los metales y los iones (Fig. 3), difundiéndolos por la vía sistémica a los órganos y en el nivel celular, a través del sistema de endomembranas.

Estudios realizados (50, 51) en células de riñón PC-12, tratadas con NPs de manganeso, detectaron un encogimiento e irregularidades en los bordes de las membranas celulares, así como una disminución en la actividad mitocondrial, dependiente de la concentración, además de la depleción de la dopamina. Mientras tanto, en otros estudios se demuestra que las AgNPs trastornan los esenciales procesos de señalización celular; entre los daños se incluye alteraciones en la viabilidad celular y muerte de la célula, siendo las NPs de 40 a 50 nm las más dañinas (52).

En células epiteliales de retina porcina expuestas a AgNPs, se detectó la inducción de la permeabilidad celular por la activación de la vía de las MAPS cinasas, así como la inhibición del factor

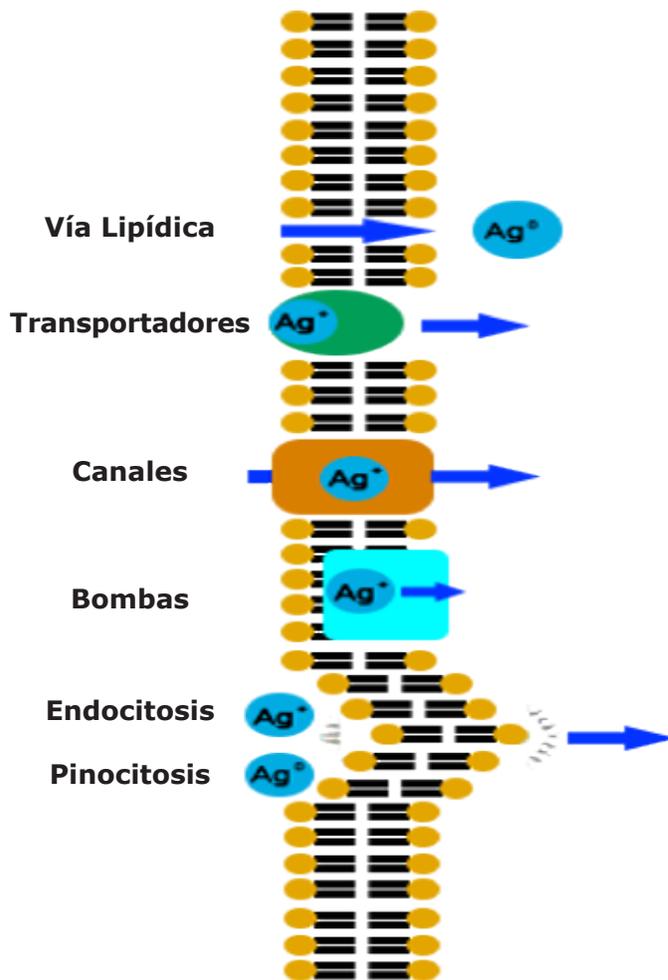


Figura 3. Esquema de los mecanismos de entrada de los metales como la plata, por la vía lipídica directa o por proteínas (transportadores, canales, bombas, endocitosis mediada por receptor), va a depender de la carga, tamaño y la concentración. Generalmente los metales se unen a proteínas de bajo y alto peso molecular así como a las metalotioninas y metaloproteasas y actuar como haptenos e inducir respuesta inmune o disminuir su toxicidad, y dentro de las células se acumulan en lisosomas o gránulos y se exocitan, y también actúan como factores de transcripción y como iones alteran las vías de transporte de electrones de todo el sistema de endomembranas (retículo endoplásmico liso, mitocondria, lisosomas, núcleo), principalmente por su afinidad y afectación de la ubiquinona o CoQ, prostaglandina, posiblemente al sistema NADPH oxidoreductasa y, que conduce a estrés oxidativo.

de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la interleucina 1 involucrada en procesos inflamatorios (53). También, en fibroblastos de pulmón y células de glioblastoma humanas, las AgNPs, con un tamaño de 6-20 nm, se localizaron dentro de la mitocondria y el núcleo; esto implica su participación directa en la toxicidad mitocondrial, lo que

ocasiona la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial y de la síntesis de ATP. En este caso, las células cancerígenas de glioblastoma cesaron su proliferación, en cambio, las células de pulmón se recuperaron (22, 23).

En el cultivo de células neuronales y astrocitos, con AgNPs de un tamaño de 20-40 nm y concentraciones de 5-100 µg/mL, la morfología de estas últimas células se altera a bajas concentraciones, mientras que las neuronas se afectan a altas concentraciones, con un incremento de EROS y de calcio, alterando la transducción de señales neuronales mediadas por éste; además, se encontró que las NPs más tóxicas fueron las pequeñas (54).

Mitocondria y estrés oxidativo

La mitocondria es la diana que desencadena la toxicidad de las AgNPs, que participan en la producción de EROS y de EO, el cual provoca cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, centro importante de señalización para la muerte celular por apoptosis, ya que se induce la liberación del citocromo c al citosol. Éste provoca la inducción de la caspasa-9 y la caspasa-3 activando la vía intrínseca del proceso de apoptosis (55) mecanismo regulado por muchas vías de señalización, entre ellas la c-Jun quinasa, perteneciente a la familia de las quinasas (JNK), activada por mitógenos; por ello, las AgNPs también tienen actividad proliferativa. Sin embargo, las JNK quinasas poseen una función proapoptótica en respuesta al estrés oxidativo celular, (56) y están implicadas en enfermedades asociadas a éste. Probablemente, la producción de EROS mantiene activada la JNK (55), ya que además el EO induce TNF α , que causa la activación de JNK y la muerte, debido igualmente a la inhibición de las MAP quinasas fosfatasa (57).

De tal manera, la disrupción de la cadena respiratoria mitocondrial por parte de las AgNPs, la producción de EROS y la interrupción de ATP están relacionadas con el daño provocado al DNA y la generación de genotoxicidad, (23) eventos muy estudiados en varios modelos (20, 29, 38, 43, 58).

La mitocondria es, por tanto, el organelo que produce mayor generación de EROS y EO le siguen el retículo endoplásmico liso y la membrana plasmática, donde precisamente se localizan la ubiquinona o CoQ, el citocromo c y el receptor de prostaglandina, principales blancos propuestos para los compuestos y derivados de plata como las AgNPs. Quizás el poder reductor de la Ag y otros metales participe en la oxidación de lípidos esenciales en las membranas, desencadenando el EO en cascada.

Se ha detectado el efecto de las AgNPs en la inducción de EO en varios modelos experimentales, como el cultivo de células mononucleares o linfocitos, a través del incremento de los marcadores de EO como el malonil-dialdehído (MDA), marcador de la lipoperoxidación (LPO), e hidroperóxidos, así como el 8 isoprostano (8 iso-p), marcador de la oxidación del ácido araquidónico, particularmente a baja concentración de 0.036 µg/mL y tiempos de exposición (30 min) a plata coloidal, marcadores asociados con la disminución en la viabilidad celular (16, 59), implicando un efecto inicial en el nivel de la membrana plasmática.

Por tanto, la exposición continua a los coloides y a las NPs de Ag representa un serio problema de salud pública, ya que generan EO y es bien conocido que éste está asociado con el desarrollo de las enfermedades crónico-degenerativas no infecciosas, posicionadas dentro de las primeras 10 causas de mortalidad y morbilidad tanto en la población mexicana como en la mundial, entre ellas, las neurodegenerativas, el Alzheimer y el Parkinson, (60) y además por los efectos tóxicos derivados del EO, como los genotóxicos, los inmunotóxicos y la desregulación hormonal, pues se ha propuesto que actúan como disruptores hormonales (61, 62).

Efectos genotóxicos de las AgNPs

Los efectos genotóxicos de las AgNPs en células humanas se deben a daños en el DNA (23, 29, 43, 52, 63, 64).

Estudios en fibroblastos de pulmón y células de glioblastoma humanas expuestas a AgNPs mostraron la inducción de aberraciones cromosómicas y la interrupción del ciclo celular en la fase G2 (23, 58).

También, después del tratamiento con AgNPs, se ha detectado que conllevan rupturas en el DNA y aberraciones cromosómicas; de igual forma, en células meristemáticas de cebolla y en el cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica, expuestos a diferentes concentraciones de Pc, se detectó que concentraciones bajas de 0.036-0.36 µgr/mL inducen el índice mitótico e incrementan el número de profases, es decir, promueven el paso de la fase G2 a mitosis y favorecen la condensación de la cromatina, detectándose la inducción de la proteína cinasa CDC2, encargada de este paso. En tanto, concentraciones mayores de 3.6 µgr/mL inhibieron el índice mitótico y la actividad de la CDC2; paralelamente, aumentó la actividad de la caspasa-3,(65) lo que indica un efecto de hormesis dual proliferativo y tóxico, posiblemente por efecto EO y EROS, a los que se atribuye la dualidad (2).

Por otra parte, se ha reportado que las AgNPs sobreexpresan P53; su activación está relacionada con daño al ADN y la inducción de Rad 51, responsable de la reparación del DNA y de la fosforilación de la H2AX inducidas por la ruptura de las cadenas de ADN, lo cual sugiere que las AgNPs son capaces de estimular daño al DNA pues se causa rupturas en el mismo y aberraciones cromosómicas (41, 58, 63, 66, 67).

En células nerviosas, se detectó un efecto citotóxico dual apoptótico y necrótico (20, 55, 58). Igualmente, en el cultivo de linfocitos, las AgNPs presentaron un efecto citotóxico de tipo necrótico a concentración dependiente y, a concentración mayor, se indujo apoptosis debido a la actividad de las caspasas-3; asimismo, en los linfocitos se causa aglomeraciones o aglutinaciones celulares, posiblemente por alteraciones en el nivel de la membrana celular o por una respuesta inmunológica (68).

El efecto dual apoptótico necrótico, resultado de las AgNPs, se ha observado en diversos modelos de estudio. Como ya se mencionó, sugiere cambios en la permeabilidad y el potencial no solo de la membrana mitocondrial, sino de los lisosomas, de tal manera que, dependiendo de su llegada a la mitocondria o al lisosoma, habrá un efecto apoptótico o necrótico, respectivamente, que conlleva un efecto inmunocitotóxico.

La Pc en sus presentaciones comerciales, expuesta en el cultivo primario de linfocitos, también indujo la actividad de la caspasa-3 y la sulfatasa ácida, enzimas marcadoras de los mecanismos de apoptosis y necrosis (65). Con respecto a la sulfatasa ácida se ha reportado que se encuentra involucrada, elevada en procesos inflamatorios como el asma y, a la baja, en procesos alérgicos.

Se considera que la necrosis participa activamente en procesos inflamatorios, mientras que la apoptosis, por ser un evento programado genéticamente, no desencadena respuesta inflamatoria, ya que forma parte de la homeostasis celular; sin embargo, trastornos en la regulación de la apoptosis por diferentes vías (intrínseca y extrínseca) están presentes en la etiopatogenia de enfermedades autoinmunes degenerativas, de tal manera que ambos procesos necrótico-apoptóticos, también por este efecto, tienen implicaciones en la salud, pues repercuten en la defensa inmune y en la homeostasis celular.

Efectos inmunotóxicos

Se ha demostrado que las AgNPs tienen un efecto en la proliferación de linfocitos, macrófagos, etcétera, y en la respuesta inflamatoria, ya que inducen la

liberación de una serie de marcadores proinflamatorios asociados con el EO, principalmente el factor de necrosis tumoral (TNF), TNF α , además del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (69) y citosinas como las interleucinas, tanto en células madre mesentéricas viables (hMSCs), con la liberación de IL-1, IL-6, TNF- α , (70, 71) como en macrófagos J774 A1, con la liberación de IL-6 e IL-8/IL-11 (72), y en células mononucleares de sangre periférica, con IL-5, INF- γ y TNF- α (71). La IL5 participa en la diferenciación del linfocito B a célula plasmática esto es producción de anticuerpos y la IL1 en la inducción de las ligeras cadenas *kappa*. Se ha propuesto que, al igual que los metales, las NPs como las AgNPs son inmunotóxicas, todo ello principalmente asociado con el EO (8, 73-76).

Los efectos inmunotóxicos, genotóxicos y citotóxicos por la exposición a NPs como las AgNPs, a consecuencia del EO, inducen la síntesis de enzimas antioxidantes, como catalasa superóxido dismutasa, hemo-oxigenasa (HO-1) (54, 59, 77), etcétera. La HO-1 es inducida no solo por el EO, sino también por metales. El EO induce factores de transcripción como NF- κ B y NFR2, involucrados en la inmunotoxicidad y en la inducción de enzimas antioxidantes como HO-1 (78).

Inducción de enzimas antioxidantes ante el EO

Existe una inducción de enzimas antioxidantes ante el estrés oxidativo originado por las AgNPs (79). Estas partículas, en células de cerebro de ratón, producen oxidación de proteínas y lípidos, el aumento de la actividad de catalasa, así como la liberación excesiva de ácido glutámico y óxido nítrico. Por su tamaño, poseen mejor movilidad; esto les permite entrar al sistema nervioso central (SNC) atravesando la barrera hematoencefálica, lo cual puede deberse a la difusión pasiva o a la endocitosis mediada por un receptor. Incluso, estas partículas son absorbidas directamente en el cerebro por transporte trans-sináptico, o bien, simplemente compiten por los transportadores iónicos de sodio y potasio o con la bomba de H⁺ probablemente, las células microgliales (macrófagos en el cerebro) estén involucradas en el manejo de las AgNPs que llegan al SNC, pues se sabe que los macrófagos del sistema reticuloendotelial son los que más las acumulan, al igual que los queratocitos de la piel, y se cree están implicados en su eliminación (27, 48).

Además, el cerebro de las ratas es uno de los blancos más sensibles para EO por la exposición a AgNPs y por la inducción, en células neuronales, de las enzimas catalasa y hemo-oxigenasa 1 (HO-1) (54). Mientras tanto, en *Drosophila melanogaster* se indujo la proteína de choque térmico 70 (HSP 70) (66), detectando que presenta una alta similitud

en la secuenciación de aminoácidos a la proteína HO-1. También, en el cultivo de linfocitos *in vitro*, se demostró la inducción de la HO-1 por efecto de la plata coloidal (80).

La vida media biológica de las AgNPs en el SNC, quizás por su solubilidad en lípidos o su afinidad por tioles de las proteínas, es más larga que en otros órganos; por tanto, algunas funciones fisiológicas importantes, riesgos y consecuencias en el cerebro, como enfermedades neurodegenerativas, pueden deberse a la exposición prolongada a éstas, aun a bajas concentraciones.

La inducción de enzimas antioxidantes, al igual que los otros parámetros, está asociada con la carga y el tamaño de las NPs. Aquellas por debajo de los 20 nm, respecto a las de arriba de 40 nm, son más dañinas y severas; de igual forma, el efecto depende del tiempo de exposición y es más severo en los lapsos cortos, como lo demuestran los estudios en células neuronales *in vitro*, donde a los 3-6 minutos de exposición a AgNPs se presenta una respuesta fuerte de calcio (Ca^{2+}) intracelular, que altera los procesos de transducción de señales neuronales e induce la actividad de la HO-1.

Asimismo, en el cultivo de células mononucleares o linfocitos expuestos a Pc, se demostró un incremento de marcadores de EO como el MDA, hidroperóxidos y 8-iso-p, vinculados con la inducción de la HO-1 y la catalasa, a 30 minutos de exposición, mientras que a dos y 24 horas, hay un aumento no significativo pero consistente y sostenible de hidroperóxidos y MDA, así como en la concentración de proteínas (16, 80). Del mismo modo, hay una disminución de la HO-1 y la catalasa, relacionadas con la viabilidad celular; también se mostró una correlación negativa de la HO-1 en función del tiempo y de la concentración de Pc. Sin embargo, un dato muy importante es la correlación positiva de 0.9 entre los 8 iso-p y la actividad de la HO-1, lo que corrobora o apunta a un efecto inicial en el nivel de la membrana y, nuevamente, se debe focalizar la ubiquinona o la coenzima Q, derivados isoprénicos que generan estructuras cíclicas o no del tipo benzoquinonas, o prostanooides como la CoQ y la prostaglandina, y el propio NAD, respectivamente; ambos son blancos de los derivados o compuestos de plata.

Finalmente, la HO-1 es una enzima inducible por metales y por EO, la cual está asociada con una gran cantidad de enfermedades crónico degenerativas (78). Además, ésta se encuentra relacionada un 90% con los 8 iso-p, es decir EO, y dado el continuo contacto con xenobióticos como las AgNPs, que son metales, y sabiendo además de su efecto en la inducción de EO y HO-1, su exposición representa un problema serio de salud pública para el desarrollo de las mencionadas enfermedades.

Posible mecanismo de acción

El efecto tóxico de las AgNPs en bacterias y células se debe principalmente a la forma iónica y su afectación en el transporte de electrones y la interrupción de la cadena respiratoria, por su principal blanco, la ubiquinona o coenzima Q en las membranas de las bacterias, y de las mitocondrias de células eucariotas que junto con el receptor de prostaglandina localizado en las membranas, son derivados del metabolismo del ácido araquidónico, compuestos del tipo isoprénico o prostanoide. Algunos derivados de la oxidación del araquidónico, entre ellos el 8 iso-p, son marcadores de EO. Sin embargo, es muy probable que 8 iso-p, a causa de su naturaleza polar, se difunda y por ello sea difícil encontrarlo dentro de la célula, ya que normalmente se ha ubicado en el plasma y la orina de fumadores, asmáticos y personas con insuficiencia renal; por tanto, se utiliza como marcador de estrés oxidativo (59).

Las membranas celulares son ricas en lípidos algunos derivados del ácido araquidónico. El efecto de la plata coloidal en la inducción de LPO, EROS y RL ocasiona que la célula pierda propiedades limitantes por cualesquiera que sean sus mecanismos propuestos de entrada de los metales y de las AgNPs (Figs. 3 y 4); por otra parte, la Ag o Ag^+ libres del coloide o el mismo coloide, como ya sabemos, no solo afectan a los derivados lipídicos como los de los isoprenos, sino también a las proteínas. Posee alta afinidad por los grupos tioles y las uniones disulfuro presentes en los receptores de membrana ricos en dominios de éstos. Otro caso sería el del receptor de prostaglandinas, uno de los blancos principales de los compuestos de plata. En las células eucariotas, al unirse específica o inespecíficamente a éste, dichas partículas podrían transportarse por la vía del sistema vesicular como la endocitosis mediada por receptor o por pinocitosis fluida, o bien, dependiendo de la carga y el tamaño, entrar libremente por difusión o a través de vesículas de caveolina; en el caso de la plata iónica, el proceso se haría por medio de transportadores iónicos, en el caso de las AgNPs, de acuerdo con el tamaño y la carga de las AgNPs, habrá un mecanismo de entrada y un efecto, como muchos autores sugieren, sin embargo las mismas propiedades que hacen únicas a las Ag NPs son las responsables de los efectos tóxicos, por la mayor superficie de contacto con los iones, pues se considera que el efecto tóxico se debe a la forma iónica por la liberación de los iones plata (1, 40, 49, 81).

En el nivel de las proteínas, entre ellas las de los receptores de membrana y nucleares, el efecto de las AgNPs primordialmente se debe a los cambios en la relación SH y S-S de proteínas de la membrana en cascada, que serían los responsables de modificar en

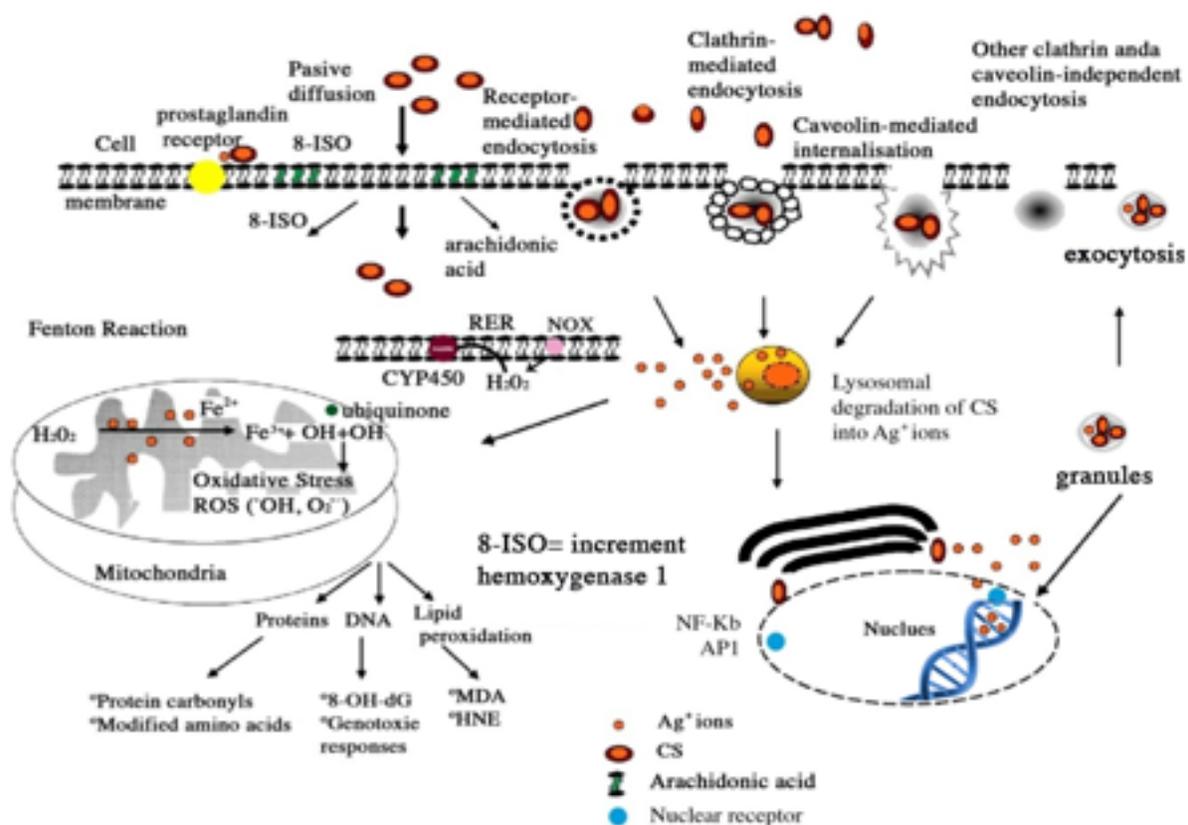


Figura 4. Esquema propuesto de los mecanismos de entrada de las AgNPs y sus posibles efectos. Entren por los mismos caminos que los metales, los efectos dependen de la carga, tamaño, la concentración, vía de entrada y van desde cambios en la permeabilidad de la membrana, de las vías de señalización, del transporte de electrones, de los marcadores de estrés oxidativo y de la expresión de genes, y alterando la homeostasis celular que conducen a citotoxicidad tipo necrosis o apoptosis. Agradecimiento a Ana Gabriela Muñoz Coutiño por el apoyo en la edición de las figuras.

cascada otras proteínas o los lípidos con la energía liberada, por el efecto reductor que tiene el calcio sobre las uniones S-S. Quizás también pasaría con los metales como la plata, o bien, las AgNPs al despolarizar la membrana o interactuar con receptores acoplados con canales, induzcan la apertura de canales iónicos, entre ellos el calcio, altera la relación de SH y S-S, incrementan el aumento de los tioles libres provocando un aumento en la permeabilidad por la apertura de poros y desencadenando los mecanismos de señalización para la toxicidad, factor común para las NPs y muchos otros compuestos químicos liposolubles, como los disruptores hormonales persistentes, que comparten efectos similares (8, 82).

Los efectos del calcio en muchos procesos celulares han sido ampliamente estudiados. En tanto, la apertura de canales de calcio también ha sido documentada para todos aquellos compuestos con propiedades despolarizantes, lo que genera ciclos de movimientos internos de calcio que pueden conlle-

var desde cambios iniciales leves de la membrana, asociados con alteraciones en la permeabilidad de la misma y que inducen proliferación, hasta concentraciones internas altas que modifiquen el potencial de membrana de la mitocondria y del retículo endoplásmico. Ambos son reservorios de calcio y su liberación conduce a muerte celular y apoptosis o necrosis si involucra a la mitocondria o al lisosoma.

Uno de los efectos más conocidos de la exposición a la plata y sus compuestos es la generación de argiria y argiriosis. La primera es la acumulación de plata en la piel y la otra, en distintos órganos. La argiria se considera un proceso de eliminación o reducción del metal y se debe a la fuerte afinidad que tienen los metales, especialmente la plata, por los grupos sulfhídricos tioles de la cisteína presente en proteínas de interés de las células y también al poder reductor sobre las uniones disulfuro de las proteínas, de los iones divalentes como el calcio; si bien la plata no es un ion divalente, bajo ciertas condiciones se comporta como tal (5, 8).

Por su parte, una de las causas del efecto tóxico de las AgNPs sería el hecho de alterar la relación de SH y S-S de proteínas esenciales, principalmente de los receptores membranales y nucleares, generando reacciones en cadena que afectan los procesos de señalización; originan cambios en la permeabilidad de las membranas plasmáticas y de orgánulos como mitocondria, lisosomas y retículo endoplásmico hasta el núcleo, y, como consecuencia, producen un desarreglo estructural y el deterioro en los procesos bioquímicos del metabolismo, desestabilizando la homeostasis celular y la reproducción. Además, se trastorna la expresión genética, es decir, se induce la síntesis de algunas proteínas, entre ellas, las de defensa química (CYP450), las enzimas antioxidantes y la IgG, así como los inmunomoduladores; también hay alteraciones en los ácidos nucleicos (DNA y RNA) (8, 38, 43, 83), todo ello asociado con la producción en cascada de los radicales libres (RL), 97 los EROS y el EO, vinculados a su vez con la relación tioles-disulfuro (86) y con el metabolismo de los sulfatos.

De tal manera, los mecanismos de entrada a las células (Fig. 4) de las NPs como las AgNPs dependerán mucho del tamaño, forma, carga y concentración; sin embargo, los efectos serán básicamente en los sistemas de membranas.

El mecanismo de acción estribará en las formas de entrada:

1.- Por difusión pasiva, puede alterar el transporte de electrones modulado por los citocromos dependientes de enzimas NADH oxidoreductasas o NADH oxidasa (NOX), localizadas en sistemas de membranas del retículo endoplásmico o en las membranas plasmáticas, o la membrana interna de la mitocondria. Para entrar por transporte pasivo, las NPs deberán ser muy pequeñas y neutras, es decir, sin carga. Se difundirán rápidamente a lo largo del sistema de endomembranas, principalmente a la mitocondria, en el caso de la plata, alterando el transporte de electrones por su afinidad a la ubiquinona e induciendo tanto radicales libres como especies reactivas de oxígeno, lo que modifica el potencial y, con ello, la liberación de factores proapoptóticos y apoptóticos para conducir a la apoptosis. Igualmente, se puede despolarizar la membrana e inducir movimiento de calcio. El poder reductor de éste altera las dobles ligaduras de los ácidos grasos o proteínas, y las uniones disulfuro, modificando también la estructura de las proteínas.

2.- Si la NP tiene carga, afectará el transporte iónico desacoplando los canales y las bombas, como se ha descrito para los metales (Figs. 3 y 4) y que dependiendo de la carga, pueden ser de sodio, de potasio y de hidrógeno, o bien, de calcio de la membrana

plasmática, o el transporte de electrones de la mitocondria o de protones del lisosoma, modificando el potencial de membrana y, con ello, su funcionalidad, e induciendo también estrés oxidativo, así como muerte apoptótica o necrótica, entre otros tipos.

3.- Las NPs de mayor tamaño, dependiendo de su polaridad, entrarán por distintos tipos de vesículas:

- Si las NPs tienen afinidad por receptores, entrarán gracias a la endocitosis mediada por receptores, ingresarán por vesículas de clatrina donde eventualmente alcanzarán el lisosoma.
- Las NPs muy grandes y con cierta polaridad entrarán por pinocitosis fluida, por vesículas lisas e igualmente alcanzarán los lisosomas.
- En el caso de que la NP sea grande, sin carga y de naturaleza liposoluble que no entre por difusión, ingresará por vesículas de caveolina; así, por su naturaleza liposoluble, quizás alcance el lisosoma, la mitocondria y principalmente al núcleo como las moléculas liposolubles.

4.- Podrían acumularse en los lisosomas y formar gránulos que eventualmente fueran vertidos al núcleo o exocitados dependiendo quizás de la fase del ciclo celular en que ocurrió su internalización.

Ahora bien, en las membranas o dentro de las vesículas o los organelos se podrán liberar los iones de las NPs y desacoplar el transporte iónico de la membrana lisosomal, expulsando su contenido e induciendo necrosis, o el de la mitocondria, llevando a la apoptosis, o bien, en el núcleo causando daño en el nivel de los receptores nucleares y afectaciones en el DNA, con lo que se altera la expresión genética. También los iones unidos a proteínas actúan como factores de transcripción.

Por otro lado, el efecto en el transporte iónico induce estrés oxidativo y con ello la producción de peróxido de hidrógeno y de iones hidroxilo, los cuales son capaces de inducir factores de transcripción como el NFK β , AP1, NRF2 y TNF α , involucrados en la expresión de genes relacionados con la defensa química y la defensa inmune, y asociados a su vez con los efectos genotóxicos e inmunotóxicos detectados por exposiciones continuas a metales o compuestos químicos (8).

De esta manera, el estrés oxidativo inducido por muchos compuestos, especialmente los iones metálicos como de sus NPs, representa un riesgo permanente para la salud no sólo laboral sino de la población(84), particularmente por el contacto incrementado con las NPs como las AgNPs, ya que desconocemos los niveles de exposición a través de los alimentos, bebidas, suplementos alimenticios y cosméticos.

A partir de marzo de 2011, se encontraron NPs en 1,317 productos comercialmente disponibles; así, las personas pueden estar expuestas a NPs, como las AgNPs contenidas en ropa, aerosoles, detergentes, frigoríficos, lavadoras, chupetes, sistemas de purificación de aguas y alimentos, pinturas para paredes y productos cosméticos; a nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂) en cosméticos y protectores solares, e incluso nanopartículas de arcilla en botellas de cerveza.

Por ello, en los últimos años, el campo de la nanotoxicología ha crecido significativamente en respuesta a las preocupaciones, tanto públicas como reglamentarias, sobre la tan controvertida era de la nanotecnología, debido a la posibilidad de un mayor incremento en usos médicos, industriales,

alimenticios y comerciales (85) y por lo tanto una mayor exposición, que traerá consecuentemente un aumento de enfermedades crónico degenerativas asociadas al estrés oxidativo desencadenado en el caso de las AgNPs, debido a su afinidad con los transportadores de electrones (ubiquinona o coenzima Q, NAPH oxidorreductasas y oxidasas) que corrobora o apunta a un efecto inicial en el nivel de la membrana plasmática y sistemas de membranas internas, y debe focalizarse en la inducción del estrés oxidativo a los derivados isoprénicos que generan estructuras no cíclicas como el ácido araquidónico o cíclicas el tipo benzoquinonas, como el propio NADH y del tipo prostanoides como la CoQ y la prostaglandina, principales blancos de los derivados y compuestos de plata, como las AgNPs. 

REFERENCIAS

1. Avalos A, Haza, AI, Mteo, D, y Morales, P (2013) Nanopartículas de plata. Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*;7(2):1-23.
2. Ivo Iavicoli EJCyMAN (2010) Exposure to nanoparticles and hormesis. Dose-response: An International Journal;8(4):501-17.
3. Magdalena - Stevanovic BK, Jana Pethovic, Metka Filipie and Dragan Oskokovic (2011) Effect of poly α , γ L-glutamic acid as a capping agent on morphology and oxidative stress-depend toxicity of silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine*;6:2837.
4. Elda Maria del Rocio Coutiño Rodríguez (2011) Defensa Química y CYP450: relación con la defensa Inmune *Revista de Investigación Médica de la Uv. [Original y revisión]*.11(2):53-63.
5. Elda Maria del Rocio Coutiño Rodríguez RAPG, Rebeca García Román, Luis Alfredo Herbert Doctor (2010) Plata coloidal y salud *Universalud*;6 (12):56.
6. Savolainen K, Alenius, H.H, Norppa, H., Pylkänen, L., Toumi T., Kasper, G. (2010) Risk assessment of engineered nanomaterial and nanotechnologies-A review *Toxicology. Potential hazard of nanoparticles Properties: From to Biological & Environmental Effects*;269:94-104.
7. Chernousova S, Epple, M. (2013) Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angew Chem Int Ed*;52: 1636-53.
8. Coutiño R, Elda maria del Rocio (2015) Plata coloidal: Xenobiótico, Antígeno y disruptor hormonal *REB* 34(1):10-25.
9. Jazmín Elizabeth García Vicencio ERRCOL, y R. Coutiño Rodríguez (2004) Efecto Bactericida de los derivados de plata coloidal, cal y cloro, en lechuga romana sin y con lavado. *Higiene*;VI(150-151).
10. Sondi I S-SB (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*;271(1):177-82.
11. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, et al. (2005) Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology*;3:6.
12. Thurman RB GC, Bitton G (1989) The molecular mechanism of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit Rev Environ Control*;18:295-315.
13. Slawson RM LH, Trevors JT. (1990) Bacterial interactions with silver. *Biometals*;3(3):151-4.
14. Liao S. RD PW, Furr J., Russell A (1997) Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in applied microbiology*;25:279-83.
15. Coutiño- Rodríguez Elda Maria del Rocio AP, Rocio Anaís Pérez Gutiérrez (2007) Plata y sus compuestos. *Altepepaktli. [Difusión]*.3 (5):29-39.
16. Marin-Llera J, O, Arroyo-Huelguera y Coutiño- Rodríguez EMR (2012) Efecto de la Plata Coloidal en la lipoperoxidación de

- linfocitos humanos. *Universalud* (antes Altepel kli);8(16):26-31.
17. Klaseen HJ (2000) A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*;26(2):131-8.
 18. Silver S PL, Silver G. (2006) Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol*;33(7):627-34.
 19. Bhattacharya R MO (2008) Biological properties of naked metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*;60(11):1289-306.
 20. Kim SC, J. E.Choi, J.Chung, K. H.Park, K.Yi, J.Ryu, D. Y. (2009) Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro Sep*;23(6):1076-84.
 21. Braydich-Stolle L HS, Schlager JJ, Hofmann MC. (2005) In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicology Science*;88(4):412-419.
 22. Asharani PV, Hande MP, Valiyaveetil S (2009) Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol*;10:65.
 23. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano Feb 24*;3(2):279-90.
 24. Alkilany AMM, C.J. (2010) Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res*;12(7): 2313.
 25. Van der Zande MV, R. J.Van Doren, E.Kramer, E.Herrera Rivera, Z.Serrano-Rojero, C. S.Gremmer, E. R.Mast, J.Peters, R. J.Hollman, P. C.Hendriksen, P. J.Marvin, H. J.Peijnenburg, A. A.Bouwmeester, H. (2012) Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano Aug 28*;6(8):7427-42.
 26. Zhang S, Bian Z, Gu C, Zhang Y, He S, Gu N, et al. (2007) Preparation of anti-human cardiac troponin I immunomagnetic nanoparticles and biological activity assays. *Colloids Surf B Biointerfaces Apr 1*;55(2):143-8.
 27. Z. Yang ZWL, R.P.Allaker, P.Reip, J, Oxford, Z. Ahmad and G Ren (2010) A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *JRSoc Interface*;7:S411-S22.
 28. Johnston H, Hutchison,G, Christensen, FM, Peters,S, Hankin, S and Stone V (2010) A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanism responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol*;40:328-46.
 29. Kyung-Taek Rim S-WS, Hyeon-Yeong Kim (2013) Oxidative DNA Damage from Nanoparticle Exposure and Its Application to Workers' Health: A Literature Review. *Safety and Health at Work*;4:177-86.
 30. Sung J, Ji,JH, Park,JD, Yoon, JU, Kim,DS, Jeon,KS, Song,MY, Jeong,J, Jan BS, Han JH, Chun,YH, Chang, HK, Lee,JH, Cho,MH, Kelman,BJ, y Yu,IJ (2009) Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci* 108:452.61.
 31. Takenaka S, Karg, E, Roth,c, Schulz H, Ziesenis,A, Heinzmann, U, Schramel P, Heyder J (2001) Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine, silver particles in rats. *Environment Health Perspectives*;4:547-51.
 32. Van Hasselt P GB, Ahmad J. (2004) Colloidal silver as an antimicrobial agent: fact or fiction?. *J Wound Care*;13(4):154-5.
 33. Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE (2005) Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett Mar 15*;155(3):377-84.
 34. Trop M (2006) Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J Trauma Oct*;61(4):1024.
 35. Braydich-Stolle LK LB, Schrand A, et al (2010) Silver nanoparticles disrupt GDN/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicol Sci*;116(5):577-589.
 36. Rosas-Hernandez HJ-B, S.Martinez-Cuevas, P. P.Gracia-Espino, E.Terrones, H.Terrones, M.Hussain, S. M.Ali, S. F.Gonzalez, C. (2009) Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett Dec 15*;191(2-3):305-13.
 37. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B Oct 30*;112(43):13608-19.
 38. Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, et al. (2008) DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol Dec 15*;233(3):404-10.
 39. Cho W, S., Cho,M., Jeong, J.,Choi,M, Cho,H:Y., Han,B.S., Kim,S.H, Kim, H.O. Lim,Y.T., Chung,B.H., Jeong J (2009) Acute toxicity and pharmacokinetics of 13nm-seized PEG. coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*;236:16-24

40. Pal S TY, Song JM (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 73:1712-20.
41. Gálvez VyTC (2010) Toxicología de las nanopartículas. *Seguridad y salud en el trabajo*;56:6-12.
42. Jiang X, Foldbjerg R, Miclaus T, Wang L, Singh R, Hayashi Y, et al. Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. *Toxicol Lett Sep* 12;222(1):55-63.
43. Klien KaG-CJ (2012) "Genotoxicity of metal nanoparticles: focus on in vivo studies". *Archiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*;63(3).
44. Milic ML, G.Pavicic, I.Zebic Avdicevic, M.Dobrovic, S.Goessler, W.Vinkovic Vrcek, I. (2015) Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells. *J Appl Toxicol Jun*;35(6):581-92.
45. Dandan Chen TXaJB (2007) Biological effects induced by nanosilver particles: in vivo study. *Biomedical Materials*;2:S126-S8.
46. Chithrani B, Ghazani,AA, Chan WCE (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake by mammalian cells *Nano Letter*;7:1542-50.
47. Drake PI HK (2005) Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann Occup Hyg*;49(7):475-85.
48. Foldbjerg RW, J. Beer, C.Thorsen, K.Sutherland, D. S.Autrup, H. (2013) Biological effects induced by BSA-stabilized silica nanoparticles in mammalian cell lines. *Chem Biol Interact Jun* 25;204(1):28-38.
49. D Lapuente J RD, Poderron C, Di Guglielmo C , Borrás M (2010) In vitro cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles. *J Toxlet*;196:S284.
50. Hussain SMH, K.L, Gearhart,J.M, Geiss,K.T., Schhlager ,J.J (2005) In vitro toxicity of nanoparticlwa in BRL3A rat liver cells. *ToxicolIn Vitro, Thirteenth International Workshop on In Vitro Toxicology Thirteenth Workshop on In Vitro Toxicology* 19:975-83.
51. Hussain SM, Javorina, A. K., Schrand, A. M., Duhart, H. M., Ali, S. F. & Schlager, J. J (2006) The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci*;92:456-63.
52. Jiang W KB, Rutka JT, Chan WC (2008) Nanoparticle-mediated cellular response in size-dependent. *Nat Nanotechnol*;3:145-50.
53. Sheikpranbabu S, Kalishwaralal K, Venkataraman D, Eom SH, Park J, Gurunathan S (2009) Silver nanoparticles inhibit VEGF- and IL-1beta-induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells. *J Nanobiotechnology*;7:8.
54. Haase AR, S.Mantion, A.Graf, P.Plendl, J.Thunemann, A. F.Meier, W. P.Taubert, A.Luch, A.Reiser, G. (2012) Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: uptake, oxidative stress and acute calcium responses. *Toxicol Sci Apr*;126(2):457-68.
55. Hsin YH, Chen, Cf; Huang, S Shic TS, Lai,PS,y Chueh, PJ (2008) The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS-and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett*;179:130-9.
56. Shen HM, Liu ZG (2006) JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med Mar* 15;40(6):928-39.
57. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M (2005) Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell Mar* 11;120(5):649-61.
58. Kim Y, Yang SI, Ryu JC (2010) Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cells lines. *Mol Cell Toxicol*;6:119-25.
59. AvilaLagunes L (2013) Determinación de la Plata coloidal en la inducción de la Hemoxigenasa 1 [Maestria en Investigacion Biomédica]. Xalapa Veracruz: Universidad de Veracruz.
60. Sompol P, Ittarat W, Tangpong J, Chen Y, Doubinskaia I, Batinic-Haberle I, et al. (2008) A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience Apr* 22;153(1):120-30.
61. Saavedra OMyC (2010) "Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico degenerativas". . *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*:32-9.
62. Konigsberg FM (2008) "Radicales Libres y Estrés Oxidativo". Editorial El Manual Moderno SAdCV, editor. México D.F
63. Ghosh M MJ, Sonai- S, et al. (2012) In Vitro and In Vivo genotoxicity of silver nanoparticles *Mut Res*;749(1-2): 60-9.
64. Ha Ryong Kim YJP, Da Young Shin, Seung Min Oh, Kyu Hyuck Chung (2013) Appropriate in vitro methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. *Enviromental Health and Toxicology*;28:1-8.

65. Elda Maria del Rocio Coutiño Rodríguez AP, Rocio Anais Pérez Gutiérrez. Plata Coloidal repercusiones en la salud CongresoXXVII Nacional de Bioquímica Mérida, Yucatan2008.
66. Ahamed Myc (2010) "Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*". . *Toxicology and Applied Pharmacology*;242:263-9.
67. Ahamed MySM (2007) Low level lead exposure and oxidative stress. *Current opinion in ClinChim Acta* 387:5764.
68. Regalado S, Ana Lilia, Coutiño Rodriguez Elda Maria del Rocio. Plata coloidal induccion de la defensa inmune primaria en linfocitos humanos en cultivo. Congreso Nacional de Bioquímica en México; Oaxaca Oaxaca2012.
69. Nishanth RP, Jyotsna RG, Schlager JJ, Hussain SM, Reddanna P Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: role of ROS-NFkappaB signaling pathway. *Nanotoxicology* Dec;5(4):502-16.
70. Greulich C, Kittler S, Epple M, Muhr G, Koller M (2009) Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbecks Arch Surg* May;394(3):495-502.
71. Seung- Heon Shin MKY, Hae-Sic Kim, Hyung-Suk Kang (2007) The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*;7:1813-8.
72. Yeng HJ HS, Tsai CL. (2009) Citotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of different Sizes. *Small*;5(13):1553-61.
73. Boraschi D, Constantino, L., Italiani, P (2011) Interaction of nanoparticles with immunocompetent cells: nanosafety considerations. *Nanomed*;7:121-31.
74. Angela Veraldini ASC, Vanessa Bolejack, Lucia Miligi, Paolo Vineis, and Henk Van Loveren (2006) Immunotoxic Effects of Chemicals: A matrix for Occupational and Environmental Epidemiological Studies. *American Journal of Industrial Medicine*;49:1046-55.
75. Armando Vega-López MLD-L, Luís Jiménez-Zamudio y Ethel García-Latorreb INMUNOTOXICIDAD, PROTOCOLOS PARA SU ESTUDIO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Jorge Ortiz Reyes, Jacinto Elias Sedeño, Eugenio Lopez Lopez 2009. Available from: <http://m.ipn.mx/pdf/ENCB/ENCB/WPS/WPS/WCM/CONNECTI/2DA7F980462>
76. Klippstein R F-MR, Castillo PM, Zaderenko AP, Pozo D, editor. *Silver Nanoparticles Interactions with the Immune System: Implications for Health and Disease*, : Pozo Perez D, Ed.; 2010.
77. Haase AM, A.Graf, P.Plendl, J.Thuenemann, A. F.Meier, W.Taubert, A.Luch, A. (2012) A novel type of silver nanoparticles and their advantages in toxicity testing in cell culture systems. *Arch Toxicol* Jul;86(7):1089-98.
78. Avila- Lagunes Lucerito O, Arroyo Huelguera y Elda Maria del Rocio, Coutiño-Rodriguez (2013) Hemooxigenasa 1: Su importancia en los mecanismos de oxidación y su relación con enfermedades no infecciosas. *UniverSalud (antes Altepeli)*;9(17):56- 61.
79. Piao MJ, Kang, K.A., Lee, I.K., Kim, H.S., Kim, S., Choi, J.Y., Choi, J., Hyun, J.W (2011) Silver nanoparticles induce oxidative damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*;201:92-100.
80. Avila Lagunes yEMdRC, editor. *Colloidal Silver: Induction of heme oxygenase 1 and its association with 8 isoprostanes*. 20th Annual Meeting of the Society for Free Radicals Biology and Medicine; 2013; Grand Hilton in San Antonio Texas USA: Free Radical Biology and Medicine
81. Borm P. J. A. RD, Haubold S. et al. (2006) The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC". . *Part Fiber Toxicol*;3:22.
82. Coutino RR (1979) Analysis of anaphase in cell culture: an adequate test system for the distinction between compounds which selectively alter the chromosome structure or the mitotic apparatus. *Environ Health Perspect* Aug;31:131-6.
83. Velázquez PM, Prieto- Gomez Berta y Contreras Perez Rocio. (2004) El envejecimiento y los radicales libres. . *Ciencias* 75:36-43.
84. Lydia Gutiérrez González MJHJyLMB (2013) Daños para la salud tras la exposición laboral a nanopartículas Medicina y Seguridad en el trabajo;59(231):276-96.
85. Sara A. Love MSAL, Melissa A. Maurer-Jones, John W. Thompson, Yu-Shen Lin, and Christy L. Haynes (2012) Assessing Nanoparticle Toxicity. *Annu Rev Anal Chem* 5:181-205.

EFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA EN LA ACTIVIDAD PLAQUETARIA*

Jesús Hernández Juárez¹, Belem Gallegos¹, Eduardo Pérez Campos Mayoral¹,
Eduardo Pérez Campos¹, Socorro Pina¹ y Pedro Hernández Cruz*¹

¹Laboratorio de Glicobiología del Cáncer. Centro de Investigación, Facultad de Medicina UNAM-UABJO.
Facultad de Medicina UABJO Oaxaca México. C.P 68020 Tel y Fax: +52 (951) 513 9784
Correo E: fuegoblanco136@yahoo.com.mx

RESUMEN

Las plaquetas son componentes esenciales en la formación de coágulos en los sitios de daño vascular, pero también en la formación de trombos, en ausencia de daño vascular. Se ha sugerido que las plaquetas de los pacientes diabéticos son hiperactivas y contribuyen a la aparición de complicaciones graves de la enfermedad, como el infarto agudo de miocardio e infarto cerebral. La hiperglucemia es tan sólo uno de los factores en la diabetes mellitus, asociados a la hiperactividad de las plaquetas, no obstante, los mecanismos por los cuales induce estos efectos continúan en estudio. Esta revisión abordará los mecanismos que relacionan a la hiperglucemia con aumento en la activación plaquetaria, así como el papel que pudiera tener la glicosilación en la activación plaquetaria.

PALABRAS

CLAVE:

Glucosa,
Plaquetas;
Glicosilación.

ABSTRACT

Platelets are essential components in clot formation mainly at sites of vascular damage, but also in the development of thrombi, in the absence of vascular damage. It has been suggested that platelets from diabetic patients are hyperactive and contribute to the occurrence of severe complications of the disease, such as acute myocardial infarction and stroke. Hyperglycemia is only one factor in DM associated with platelet hyperactivity, however, the mechanisms that induce these effects are not completely understood. This review will address the mechanisms that relate hyperglycemia with increased platelet activation, as well as and the role of glycosylation on the platelet activation.

KEY WORDS:

Glucose,
Platelets,
Glycosylation.

INTRODUCCIÓN

En la población general, los valores de glucemia se distribuyen como una variable continua y, en consecuencia, el valor del punto de corte entre la normalidad y la diabetes es difícil de determinar y conlleva un cierto grado de arbitrariedad. De hecho, el umbral diagnóstico ha ido cambiando con los años. Idealmente, el valor de corte elegido debería identificar a individuos con alto riesgo de desarrollar complicaciones macro o microvasculares por hiperglucemia que se beneficien de un tratamiento hipoglucemiante. Actualmente, se toman como valores de corte aquéllos en los que, en algunas

poblaciones estudiadas, aparece la complicación microvascular órgano-específica más caracterizada: la retinopatía diabética.

La hiperglucemia, término que se refiere a valores elevados de glucosa en circulación sanguínea (>100 mg/dl) y cuando sobrepasa los 240 mg/dl es un factor reconocido que ocasiona daño vascular, al inducir, la acumulación de sorbitol y fructosa a través de la vía del poliol; incremento en la formación de los productos finales de la glicación avanzada (PFGA), activación de la enzima proteína cinasa C (PKC) y del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB) (1). Los mecanismos antes descritos tienen en co-

mún el desarrollo de estrés oxidativo. Sin embargo, información más reciente sugiere que la adición incrementada de N-acetil glucosamina (GlcNAc) a las proteínas del endotelio (2) podría afectar sus propiedades antiplaquetarias. Lo anterior, es la consecuencia de un incremento en el flujo de glucosa a través de la vía biosintética de las hexosaminas (VBH) que se origina en respuesta a la hiperglucemia. La presente revisión tiene como objetivo describir los posibles efectos de la hiperglucemia en la actividad plaquetaria

PLAQUETAS

Las plaquetas son fragmentos celulares sin núcleo, con un diámetro aproximado de 2 a 5 μm y un grosor de 0.5 μm , que se originan de la fragmentación de los megacariocitos en médula ósea. Las plaquetas poseen gránulos que contienen sustancias biológicamente activas, los más importantes son los gránulos densos, los gránulos alfa y los lisosomas. Cuando las plaquetas se activan, ya sea por adhesión a ligandos de la matriz subendotelial o por agonistas solubles, vacían su contenido a la circulación. Los gránulos densos contienen ADP/ATP, polifosfato inorgánico, pirofosfato, serotonina y calcio, y liberan su contenido por exocitosis. Los lisosomas contienen catepsinas, elastasas, fosfatasas y glicosidasas que son responsables de la degradación de proteínas de la matriz celular (3). Las plaquetas tienen un papel importante en la modulación de la respuesta inmune innata debido a que poseen actividad fagocítica y antibacteriana rudimentaria (4) y en la respuesta inmune adaptativa, además de que contienen citocinas proinflamatorias como la Interleucina-1 (IL-1), de esta manera modula la respuesta inmune e inflamatoria. Las plaquetas, tienen un papel en el inicio de la inflamación, la angiogénesis, la aterosclerosis, el desarrollo y el crecimiento del tumor linfático, así mismo, contribuyen a enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 2 (5). Participan en la homeostasia primaria formando un tapón que evita la pérdida sanguínea en los sitios de daño vascular. Para cumplir con este objetivo, las plaquetas deben activarse y agregarse entre ellas en un proceso conocido como agregación plaquetaria. La figura 1 muestra de manera simplificada la participación de las plaquetas en la homeostasia.

ACTIVACION PLAQUETARIA

Activación por receptores de adhesión

El inicio de la activación plaquetaria ocurre cuando los receptores de adhesión de las plaquetas interac-

cionan con las proteínas de la matriz extracelular en los sitios de daño vascular. La glicoproteína VI (GPVI), el complejo glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V) y la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, también conocida como glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) son las principales moléculas de adhesión de las plaquetas involucradas en su activación. Aunque las vías de señalización difieren entre estas proteínas, comparten algunas similitudes como es la activación de las cinasas de la familia Src (SFK, por sus siglas en inglés) y de la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), que fosforila al fosfatidilinositol (PtdIns). La vía de la PI3K es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana con actividad de tirosina cinasa, los cuales se autofosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS); éste último, a la vez, fosforila a la subunidad p85 de la PI3K. La fosforilación de la subunidad p85 conduce a un cambio conformacional de dicha proteína que conduce a la unión de la subunidad catalítica (p110). La PI3K activa, fosforila el PtdIns(4,5)bisfosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero PtdIns(3,4,5) trisfosfato (PIP3), el cual, conduce al anclaje y la activación de la proteína cinasa B (PKB o Akt).

En las plaquetas se requiere a la proteína Lyn de la familia de las SFK en la activación de PI3K. PI3K actúa en conjunto con la enzima fosfolipasa $C\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$) para que ésta última conduzca a la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P2) formando segundos mensajeros: inositol-trisfosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (6,7), los cuales promueven la movilización de calcio y la activación de la proteína PKC, respectivamente.

El factor de von Willebrand (VWF), es una proteína adhesiva que se une a varios ligandos que son componentes esenciales del proceso hemostático, se une a: 1. Plaquetas y al subendotelio, a fin de fomentar la adhesión plaquetaria, 2. Plaquetas activadas, a fin de fomentar la agregación plaquetaria y 3. Al factor VIII (FVIII), para evitar la degradación prematura de este cofactor de coagulación. La interacción del factor de von Willebrand (VWF) con la GPIb activa a las plaquetas mediante un mecanismo dependiente de la activación de Akt por la vía de señalización PI3K-Akt (6,7). Se ha propuesto que Akt activa a la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés) en las plaquetas y que probablemente, el óxido nítrico (NO) incremente los niveles plasmáticos del guanosin monofosfato cíclico (GMPc), lo cual conlleva a la activación de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) y de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). De manera paralela se ha sugerido un mecanismo regulado por SFK que involucra la

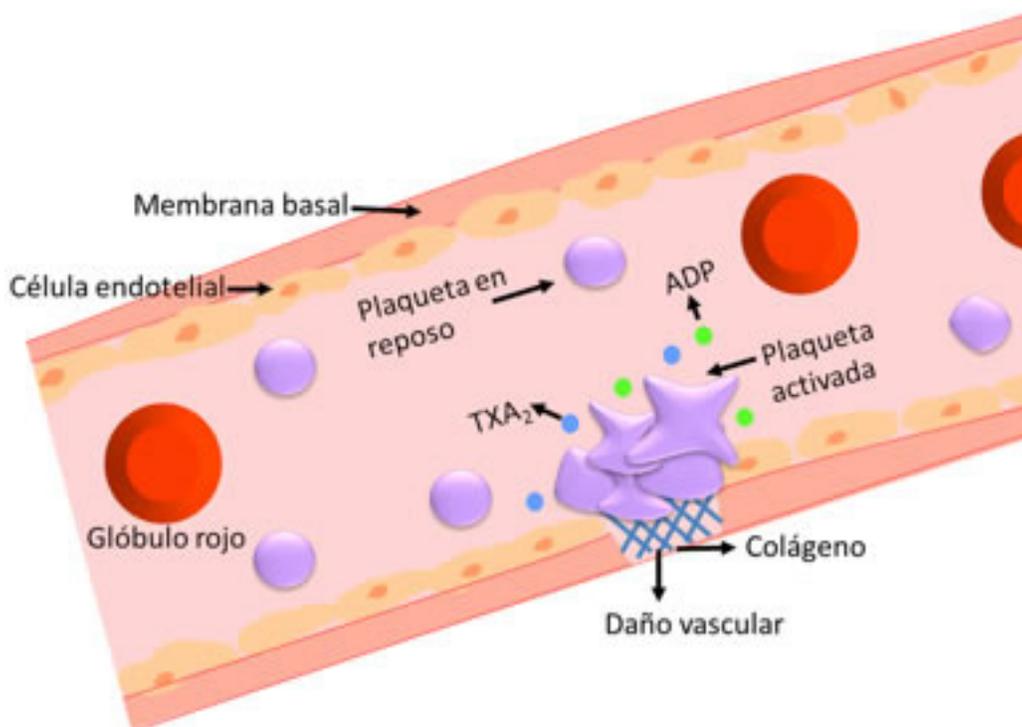


Figura 1. Funciones de la plaqueta en la hemostasia. El principal papel fisiológico de las plaquetas se cree que es en la hemostasia. Normalmente, las plaquetas circulan en la sangre en la periferia de los vasos sanguíneos, manteniéndose inhibidas por efecto del endotelio. Luego de una lesión vascular la hemostasia se activa para evitar la hemorragia. En el primer paso de este proceso, la exposición de las proteínas de la membrana basal, como el colágeno, permite que las plaquetas se adhieran al sustrato. Las plaquetas adheridas posteriormente se agregan y liberan mediadores de activación plaquetaria, tales como ADP y TXA₂, los cuales activarán a más plaquetas en el sitio de la lesión. La activación plaquetaria es crucial para la formación de fibrina en la hemostasia secundaria. TXA₂: tromboxano A₂. ADP: Adenosin difosfato.

activación de la guanilil ciclasa soluble (GCs) para la producción de GMPc en las plaquetas (6,7). Al parecer, la elevación moderada del NO y del GMPc tiene efectos estimulatorios en las plaquetas y no efectos inhibitorios.

Activación por los agonistas plaquetarios

Las plaquetas requieren el estímulo de distintos agonistas: trombina, serotonina y epinefrina para continuar con su activación. Además, en respuesta a algunos agonistas, el ácido araquidónico, una molécula intracelular, produce tromboxano A₂ (TXA₂) que amplifica las vías de activación plaquetarias. Los agonistas plaquetarios ejercen sus efectos al interaccionar con sus receptores acoplados a proteínas G. La trombina es el agonista plaquetario más potente, se une a los receptores activados de proteasas 1 y 4 (PAR1 y PAR4) que interaccionan con las proteínas Gq y G11/13, y probablemente con la proteína Gi. Al igual que la trombina, los receptores de ADP (receptor P2Y₁₂ y P2Y₁), TXA₂ (receptor de prostaglandinas H₂), serotonina (re-

ceptor HT2a) y epinefrina (receptor α₂ adrenérgico) se acoplan también a sus respectivas proteínas G.

Las vías de activación difieren entre los agonistas plaquetarios, sin embargo, éstas convergen en algunos puntos de la señalización intracelular, como es la hidrólisis del PtdIns y la activación de la PI3K. La PLCβ activada (por receptores acoplados a la proteína Gq) hidroliza al PtdIns(4,5)P₂ obteniéndose IP₃ y DAG, para que posteriormente en la señalización intracelular se activen las proteínas CaI DAG-GEF-1 (por sus siglas en inglés: calcium and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor 1) y PKC, involucradas en la regulación de la secreción granular, síntesis de TXA₂ y la activación de la GPIIb/IIIa (6,7). Por su parte, el acoplamiento del receptor P2Y₁₂ del ADP a la proteína Gi es un mecanismo de activación de la PI3K en las plaquetas que, tras una serie de señales intracelulares, promueve la síntesis de TXA₂. La vía PI3K y de la PLC convergen en un punto clave de la señalización plaquetaria, y lo hacen a través de la regulación de la actividad de la proteína Rab1, un elemento esencial en la

activación de la GPIIb/IIIa, y por consiguiente, en la agregación plaquetaria.

Al igual que la activación de la GPIIb/IIIa, la secreción granular se desarrolla tras la convergencia de distintas vías de señalización celular. Entre los productos liberados de los gránulos plaquetarios (α y densos) se encuentra el agonista ADP, calcio, mediadores inflamatorios, quimiocinas, factores de crecimiento, factores procoagulantes, anticoagulantes y proteínas de la fibrinólisis. Algunas proteínas asociadas a las membranas de los gránulos plaquetario migran a la superficie celular sólo cuando las plaquetas se activan. Los gránulos plaquetarios contienen proteínas que en investigación clínica y básica se utilizan como marcadores de activación plaquetaria, en especial la proteína P-selectina.

HIPERGLUCEMIA Y ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

La hiperglucemia es un factor desencadenante de la hiperactividad plaquetaria en la diabetes mellitus. El aumento de: calcio intracelular, volumen plaquetario medio (VPM), expresión de P-selectina, factor plaquetario 4, beta tromboglobulina, glicoproteína V, trombospondina 1, así como la síntesis de tromboxano B2, corresponden a marcadores de activación plaquetaria en la DM (8).

El VPM aumenta con los valores de glucemia y hemoglobina glicada (HbA1c) (9), sin embargo, es importante aclarar que el VPM no se asocia de manera independiente con la glucemia ni con la DM (10).

La expresión de proteínas de membrana como P-selectina aumenta en plaquetas expuestas a concentraciones elevadas de glucosa o durante la hiperglucemia aguda, así como la expresión de glicoproteínas plaquetarias (Ib y IIB/IIIa).

El incremento de calcio intracelular es otro dato de activación plaquetaria. En este sentido, las concentraciones elevadas de glucosa incrementan la expresión los canales catiónicos de receptores de potencial transitorio 6 (TRPC6, por sus siglas en inglés) en la membrana de las plaquetas y esta respuesta es dependiente de la vía de la PI3K (14).

La hiperglucemia induce daño oxidante al promover el incremento de las especies reactivas del oxígeno (ERO) (15). Los pacientes con DM, sintetizan más TXA2 en respuesta a los agonistas plaquetarios que las plaquetas de personas sin la enfermedad, probablemente debido al aumento en la actividad de la enzima ciclooxigenasa 1 (16). Durante la oxidación del ácido araquidónico por las ERO se producen intermediarios metabólicos como el isoprostanoide 8-iso-PGF2 α , el cual está

incrementado en los pacientes con DM (17). En las plaquetas, el 8-iso-PGF2 α incrementa la expresión de la GP IIB/IIIa, la concentración intracelular de calcio, y disminuye los efectos antiplaquetarios del óxido nítrico (NO) (18). Debido a la correlación entre la concentración de 8-iso-PGF2 α y TXA2, se ha propuesto al estrés oxidativo como un mecanismo de activación plaquetaria.

En 2011, Tang y cols., propusieron otro mecanismo por el cual la glucosa activa a las plaquetas (19). El estudio propone que la hiperglucemia y el colágeno actúan sinérgicamente en las plaquetas activando a la enzima aldosa reductasa dependiente de la vía del poliol, la activación de la enzima favorece la producción de ERO las cuales actúan sobre la vía de PLC γ 2/PKC/p38 α MAPK que conlleva a la activación de PLA2. Como resultado, se provee de más ácido araquidónico a la enzima COX-1, lo cual favorece la síntesis de TXA2 y con ello, que las plaquetas sean hiperactivas.

Aunque los mecanismos de activación plaquetaria no están completamente dilucidados, se sabe que la hiperglucemia induce cambios en la bioquímica de las plaquetas. Dichos cambios se relacionan normalmente con la activación de las vías de señalización celular (12, 19, 20). En adición, estudios recientes muestran que la expresión de microRNAs (miRNAs) en las plaquetas se relaciona con activación plaquetaria (21-23). Por ejemplo, Yang y cols., en 2016 (22) observaron que la expresión de los miRNAs, miR-223 y miR-144, está alterada en pacientes con DM tipo 2 (con y sin enfermedad vascular cerebral isquémica), en comparación con donadores sanos. Se observó que la expresión de miR-223 y miR-144 en las plaquetas y en el plasma correlacionaba con la expresión del receptor P2Y12 del ADP y el sustrato del receptor de insulina tipo 1 (IRS-1), así como con la glucemia y expresión de P-selectina. Además, la fosforilación de IRS-1, PI3K y Akt estaba alterada en los pacientes diabéticos. Los autores concluyen que la hiperglucemia podría activar a las plaquetas a través de miR-223 y miR-144, disminuyendo y aumentando la expresión de IRS-1 y del receptor P2Y12, respectivamente, afectando de esta manera, la vía de señalización plaquetaria de IRS-1/PI3K/Akt.

Finalmente, los cambios bioquímicos de la plaqueta en la hiperglucemia modifican la función de las mismas. La hipersensibilidad de las plaquetas a sus agonistas (11, 12, 24), la agregación (11, 12) y secreción plaquetaria (24) incrementadas, definen en gran medida, la disfunción plaquetaria de los pacientes diabéticos.

Los efectos de la hiperglucemia en las plaquetas se resumen en la tabla 1 y figura 2.

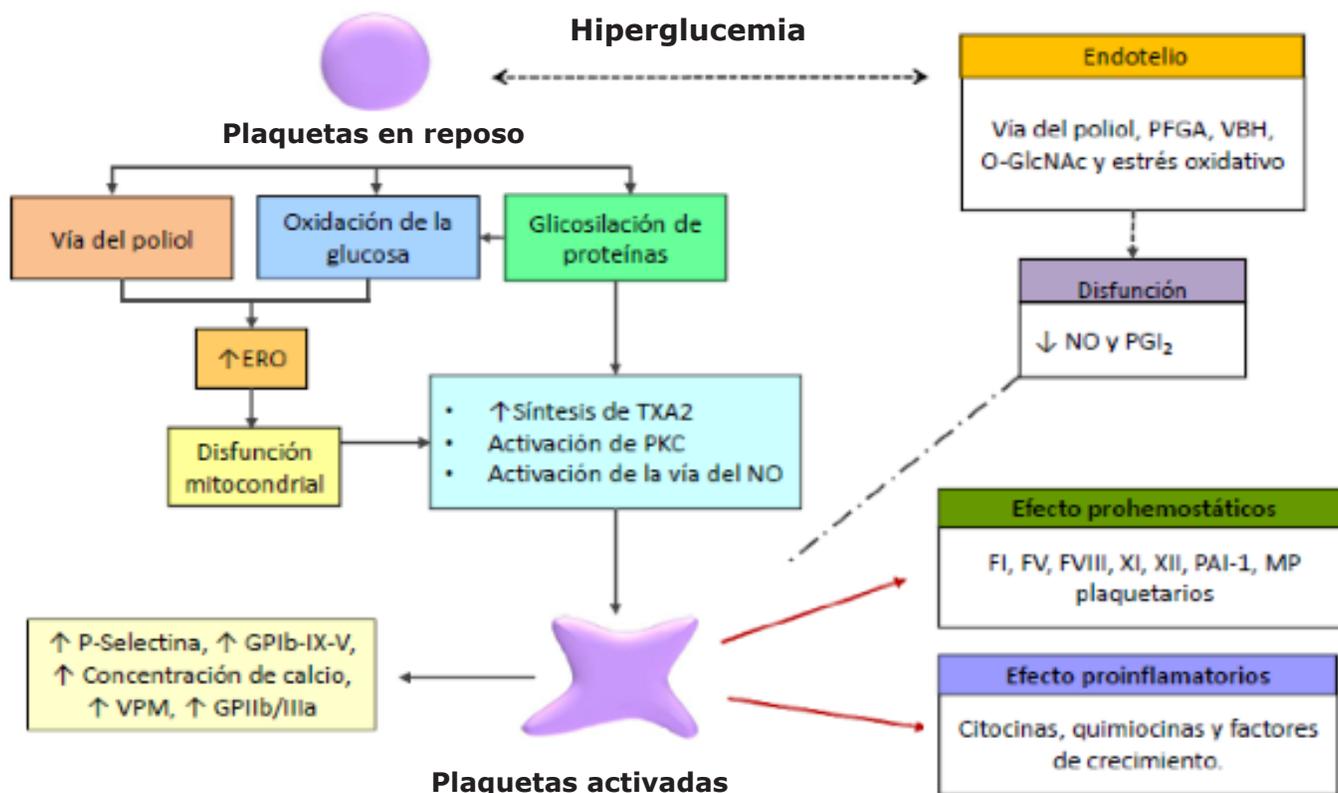


Figura 2. La hiperglucemia en la activación plaquetaria. Los mecanismos de activación plaquetaria mediados por la hiperglucemia no son claros. Sin embargo, se sugiere que el incremento de ERO y la glicosilación de proteínas inducen señales intracelulares en las plaquetas causando que estas se activen, como la activación de la vía de PKC que a su vez permite la síntesis de TXA2 y activar la vía del óxido nítrico. Como resultado, las plaquetas incrementan de tamaño, cambian su forma, secretan su contenido granular, incrementan la expresión de proteínas de membrana (P-selectina, GP Ib-IX-V, GP IIb/IIIa, entre otras) y aumentan los niveles calcio intracelular. Además, las plaquetas activadas liberan MP plaquetarias. En conjunto, estos cambios conducen a que las plaquetas se agreguen unas con otras, pero además, las plaquetas activadas promueven la formación de fibrina y la inflamación al proporcionar factores procoagulantes y mediadores inflamatorios. Debido a que el endotelio tiene propiedades antiplaquetarias, la disfunción de estas células, causada por la hiperglucemia, activa indirectamente a las plaquetas. El estrés oxidativo y la glicosilación (enzimática y no enzimática) de proteínas del endotelio son factores clave en la activación de las plaquetas. ERO: Especies reactivas del oxígeno; MP: Microparticulas; NO: Óxido nítrico; PAI-1: Inhibidor del activador tisular del plasminógeno tipo 1; PFGA: Productos finales de la glicación avanzada; PGI₂: Prostaciclina; PKC: Proteína cinasa C; TXA2: Tromboxano A2; VBH: Vía biosintética de las hexosaminas; VPM: Volumen plaquetario medio.

Tabla 1. Alteraciones bioquímicas y funcionales de las plaquetas en la hiperglucemia.

| Alteraciones bioquímicas | Referencia |
|--|------------|
| Activación de vías de señalización celular | 12,19,20 |
| Síntesis incrementada de TXA2 | 13 |
| Movilización de Ca ²⁺ | 14 |
| Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial | 12,15,19 |
| Disminución de miRNA | 21,22,23 |
| Alteraciones funcionales | |
| Aumento del volumen plaquetario medio | 9,10 |
| Sensibilidad incrementada a los agonistas plaquetarios | 11,12,24 |
| Activación de la GPIIb/IIIa | 11,12 |
| Expresión incrementada de proteínas de membrana | 11,12,13 |
| Incremento de la secreción granular | 24 |

GPIIb/IIIa: glicoproteína IIb/IIIa; TXA2: tromboxano A2

Glicosilación no enzimática y glicosilación enzimática en la activación plaquetaria

La activación plaquetaria en la hiperglucemia requiere de mecanismos alternos como pudiera ser la glicosilación de proteínas. La glicosilación ocurre normalmente en las células, pero su incremento puede causar alteraciones en el funcionamiento de las mismas. La glicosilación no enzimática (GNE, o simplemente glicación) consiste en el ataque directo de la glucosa a las proteínas en un proceso que depende de la concentración de glucosa del medio y de la vida media de las proteínas. La GNE ocurre principalmente en proteínas de vida media prolongada. En las primeras horas de la GNE, se produce una base de Schiff la cual se origina de la unión del grupo amino de la lisina con el carbonilo de la glucosa. Transcurridos unos días, la base de Schiff se convierte en un producto más estable, conocido como producto de Amadori. Si la hiperglucemia persiste durante semanas, se producen los productos finales de glicación avanzada (PFGA o AGE, por sus siglas en inglés). Los PFGA se forman en reacciones oxidativas y no oxidativas. Además de los PFGA unidos a proteínas, también se forman productos dicarbonílicos y especies de oxígeno reactivas (ERO). Los productos dicarbonílicos pueden provenir de la oxidación de monosacáridos en solución y después formar enlaces entrecruzados con proteínas en un proceso llamado glicación autooxidativa. Las plaquetas poseen receptores para PFGA, y que éstas se activan al ser estimuladas con estos productos. Sin embargo, aunque las plaquetas sufren GNE, es poco probable que en ellas se formen PFGA debido a que viven poco tiempo en el organismo.

La glicosilación enzimática comprende a la N y O-glicosilación, la primera consiste en la unión de carbohidratos al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina, mientras que en la O-glicosilación los carbohidratos se unen al grupo hidroxilo de la cadena lateral de los aminoácidos serina o treonina. El estudio de Wang y cols., en 2012 (25), muestra la importancia de la O-glicosilación en la función de las plaquetas. Se demostró que este proceso es fundamental para la función adecuada de las proteínas implicadas en la adhesión (GPIIb-IIIa) y agregación plaquetaria (GPIIb/IIIa), además, se desconoce si la O-Glicosilación pudiera contribuir a la hiperactividad plaquetaria.

Efectos de la O-GlcNAcilación en las plaquetas

Durante la hiperglucemia la concentración de glucosa se pueden incrementar en las plaquetas, existe la posibilidad de que la glucosa ingrese a la

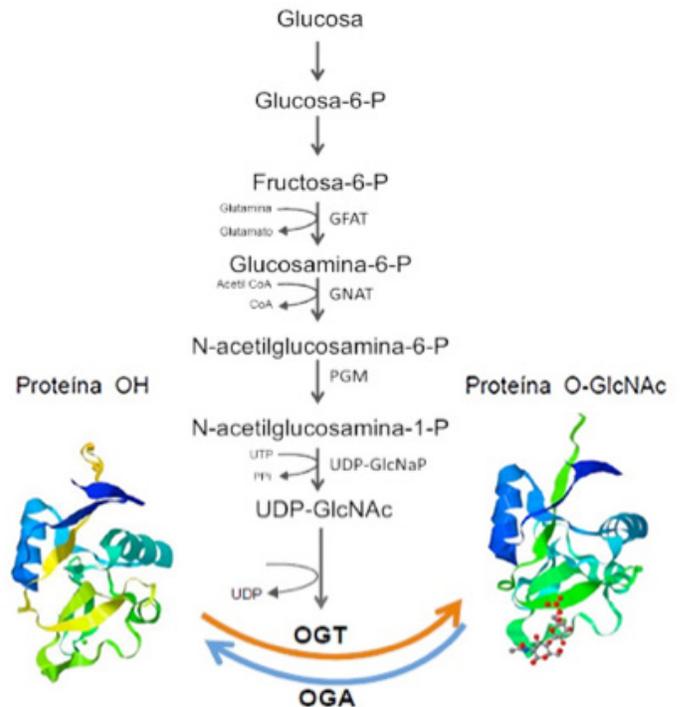


Figura 3. Vía biosintética de las hexosaminas y O-GlcNAcilación. Del 2 al 3% de la glucosa que ingresa a las células se dirige a la VBH para producir UDP-GlcNAc, sustrato de la enzima OGT. La glucosa ingresa como fructosa-6-fosfato a la VBH, posteriormente la enzima GFAT cataliza la formación de glucosamina-6-fosfato, la cual es convertida a N-acetilglucosamina-6-fosfato y una reacción más tarde a N-acetilglucosamina-1-fosfato por acción de las enzimas GNAT y PGM, respectivamente. En una reacción final, la enzima UDP-GlcNAcP cataliza la formación de UDP-GlcNAc a partir de UTP y N-acetilglucosamina-1-fosfato. La enzima OGT adiciona GlcNAc a las proteínas en una reacción que tiene lugar en grupos hidroxilo de residuos de serina o treonina. La O-GlcNAcilación es un fenómeno reversible, la enzima OGA retira la GlcNAc de las proteínas, regulando de esta manera la actividad de la enzima OGT. GFAT: Glucosamina: fructosa-6-fosfato aminotransferasa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; GNAT: Glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa; OGA: O-GlcNAc hidrolasa; O-GlcNAc: O-GlcNAcilación; OGT: O-GlcNAc transferasa; PGM: Fosfoacetilglucosamina mutasa; UDP-GlcNAc: Uridin difosfato N-acetilglucosamina; UDP-GlcNAcP: UDP-N-Acetilglucosamina pirofosforilasa; VBH: Vía biosintética de las hexosaminas.

vía biosintética de las hexosaminas (VBH), aumentando la O-GlcNAcilación (O-GlcNAc) de proteínas.

La vía de las hexosaminas, inicia con la incorporación de glutamina por la enzima glutamina fructosa-6-fosfato aminotransferasa (GFAT), la cual cataliza la formación de glucosamina-6-fosfato a partir de fructosa-6-fosfato y la glutamina. A partir de este punto se desencadena una serie de reaccio-

nes enzimáticas que culminan con la formación de uridin difosfato N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc), sustrato de la enzima O-GlcNAc transferasa (OGT) (26) (Fig. 3). La O-GlcNAc de proteínas es una modificación postraduccional, análoga a la fosforilación, la cual regula la localización, estabilidad y actividad de muchas proteínas. Consiste en la adición de unidades de GlcNAc a grupos hidroxilo en residuos de serina y treonina de proteínas localizadas en el citoplasma, núcleo y mitocondria. La adición de unidades de GlcNAc a las proteínas es catalizada por la enzima OGT y es removida por la enzima O-GlcNAcase (OGA) (26) (Fig. 3).

La O-GlcNAc regula las concentraciones de glucosa en la sangre al modificar proteínas que regulan la expresión del gen de la insulina, como el factor de transcripción PDX-1 (27). Alejandro y cols., en 2015 (28) demostraron en ratones knockout para OGT, que la O-GlcNAc es un proceso que regula la función y supervivencia de las células β pancreáticas.

En relación a lo anterior, la modificación del receptor de insulina (IR), y de IRS-1 y 2 por la O-GlcNAc afecta la vía de supervivencia celular de PI3K/Akt en las células beta pancreáticas, haciendo más susceptibles a estas células a la apoptosis (29).

Las células endoteliales (CE) son células altamente especializadas, capaces de adaptar su estado funcional a estímulos diversos, por lo que el endotelio ejerce diversas funciones ateroprotectoras: regula la coagulación, la trombosis y el sistema fibrinolítico, modula la actividad de las células musculares de la capa media (tono vascular/proliferación) y controla el tránsito de macromoléculas y células inflamatorias a la pared. Cuando estas funciones son perturbadas (disfunción endotelial) se favorece el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, por otro lado, las células endoteliales se encuentran continuamente reconociendo y respondiendo en forma activa frente a los cambios que ocurren en el ambiente extracelular local, como sucede en presencia de bacteremia, trauma, isquemia-reperfusión, etc. En otras palabras, la activación de la célula endotelial se produce como respuesta adaptativa normal y la forma de presentación y duración de ésta dependerá del tipo de estímulo.

La O-GlcNAc disminuye la síntesis de NO (30), lo que sugiere que las células endoteliales están activadas o son disfuncionales. Federici y cols., en 2002 (31) hicieron evidente que la hiperglucemia y la activación de la VBH afectan la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) por Akt. Se demostró que el IRS-1 es altamente modificado por la O-GlcNAc, teniendo como resultado la disminución de la fosforilación y de la

activación de las proteínas de la vía de la insulina (IR/IRS/PI3K/Akt/eNOS).

En la actualidad, no se cuenta con información contundente que demuestre cuál es el papel fisiológico o patológico de la O-GlcNAc en las plaquetas. La información se limita a un solo estudio realizado en plaquetas de ratón provenientes de dos modelos experimentales de DM (tipo 1 y 2) (32). Los resultados revelaron de manera general que en las plaquetas de los ratones hay proteínas modificadas por la O-GlcNAc y que las enzimas OGT y OGA se encuentran expresadas en las plaquetas. Aunado a estos resultados, se demostró que la expresión de la O-GlcNAc, es muy similar en las plaquetas de los ratones control y las plaquetas de los ratones diabéticos. Ferreira y cols., en 2004 (33) demostraron que la insulina atenúa la función plaquetaria al interferir con la supresión del AMPc mediante la interacción del IRS-1 con la proteína Gi. El AMPc es un inhibidor fisiológico de las plaquetas que se forma por acción de la enzima adenil ciclasa (AC). Ésta última es inhibida por la proteína Gi acoplada al receptor P2Y₁₂ del ADP. Ferreira y cols., (33) demostraron que la insulina promueve la fosforilación y asociación del IRS-1 con la proteína Gi, teniendo como resultado la disminución de la actividad de ésta última enzima, efecto que se tradujo en una reducción de los niveles intracelulares de AMPc y una respuesta débil de la movilización de calcio por efecto de los agonistas plaquetarios, ADP y trombina. Considerando este mecanismo, surge la hipótesis de que si en las plaquetas de pacientes con DM-2, la modificación del IRS-1 por la O-GlcNAc induce resistencia a los efectos inhibitorios de la insulina (Fig. 4).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las plaquetas no tienen receptores para glucosa, la activación de las plaquetas en los pacientes con DM-2 debe estar sujeta a otros mecanismos. La glicosilación de proteínas induce cambios en la estructura y función de las proteínas, de tal manera que, en las plaquetas, este evento bioquímico suscitado en las membranas de las plaquetas, y quizá, en proteínas citoplasmáticas o de los gránulos, pudiera inducir activación plaquetaria. Debido a que la O-GlcNAc afecta las vías de señalización celular, es probable que este evento contribuya a la activación plaquetaria. No podemos descartar que los efectos de la O-GlcNAc de proteínas en las plaquetas ocurran a nivel del megacariocito en la médula ósea, predisponiendo probablemente a que las plaquetas que deriven de él sean hiperactivas, o en el contexto contrario, que la O-GlcNAc sea inocua en las plaquetas.

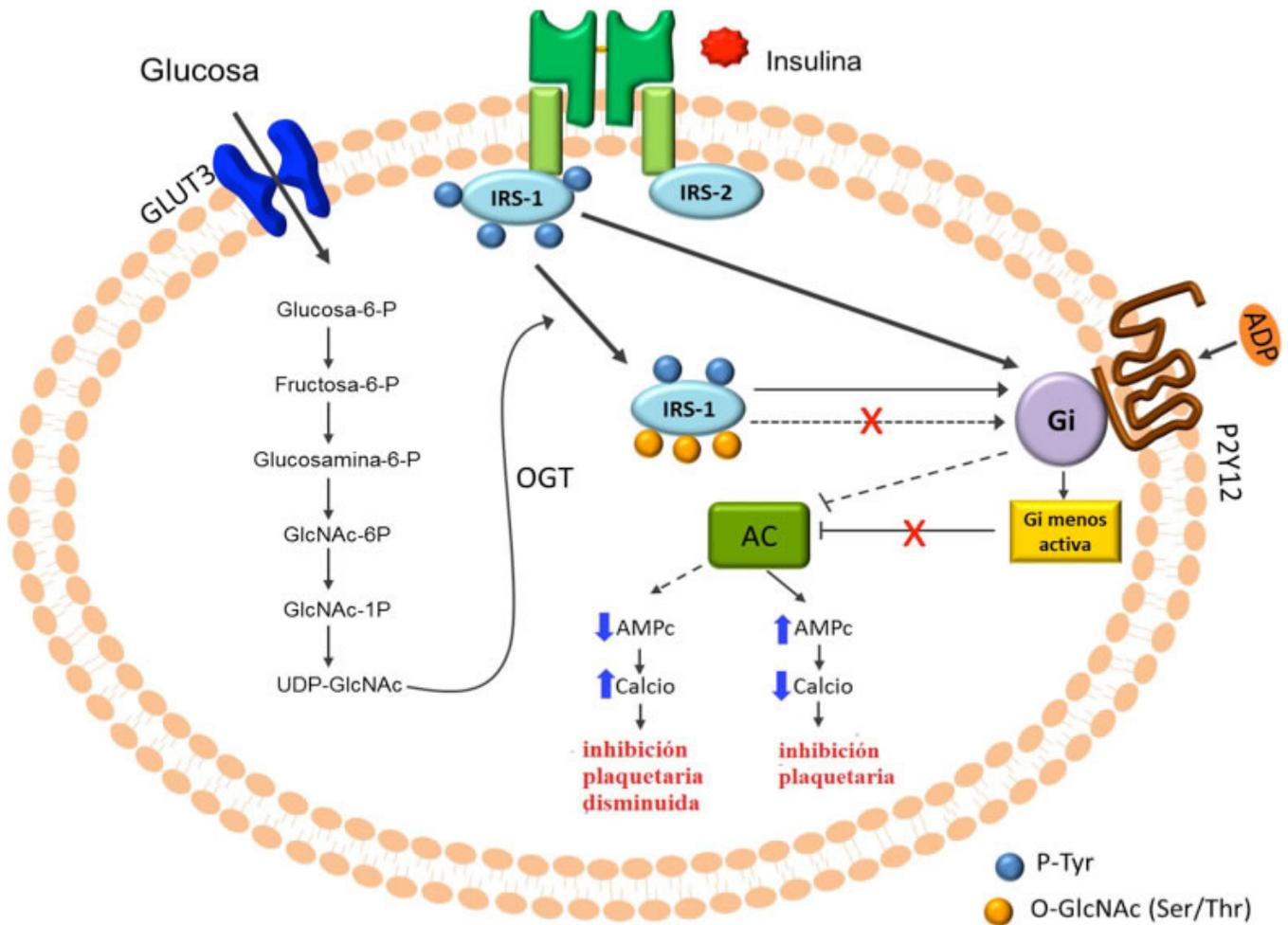


Figura 4. Mecanismo hipotético de los efectos de la O-GlcNAcilación en la plaqueta. Gi es una proteína que se acopla a receptores como el de ADP, (receptor P2Y12) suprimiendo la formación de AMPc, un inhibidor fisiológico de las plaquetas. Por lo tanto, el ADP activa a las plaquetas. La interacción de la insulina con su receptor desencadena reacciones intracelulares incluyendo la fosforilación del IRS-1 en residuos de tirosina. Gi disminuye su actividad al interactuar con IRS-1 afectando su efecto inhibitorio sobre la enzima AC, la cual cataliza la producción de AMPc e indirectamente, regula los niveles de calcio intracelular. En condiciones hipotéticas de hiperglucemia, el ingreso elevado de glucosa a las plaquetas podría estimular el proceso de O-GlcNAcilación. Probablemente, la adición de GlcNAc a IRS-1 por acción de la OGT interfiera con su fosforilación en residuos de tirosina, afectando de esta manera su interacción con Gi. En consecuencia, Gi inhibiría a la enzima AC con la concomitante supresión de los niveles de AMPc y sus efectos inhibitorios sobre las plaquetas. AC: Adenil ciclase; ADP: Adenosin difosfato; AMPc: Adenosin difosfato cíclico; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Gi: Proteína Gi; GLUT3: Transportador de glucosa 3; IRS-1: Sustrato del receptor de insulina tipo 1; IRS-2: Sustrato del receptor de insulina tipo 2; O-GlcNAc: O-GlcNAcilación; OGT: O-GlcNAc transferasa; pTyr: Fosforilación de residuos de tirosina; UDP: Uridin difosfato.

El conocimiento de nuevos mecanismos moleculares en la activación plaquetaria permitirá diseñar mejores fármacos para el tratamiento de los pacientes diabéticos que sufren complicaciones relacionadas con las plaquetas. En el

caso de la O-GlcNAc, más que pensar en el desarrollo de nuevos fármacos, su relación directa con la hiperglucemia exhorta a que el control de la glucemia en los pacientes diabéticos sea más estricto.



REFERENCIAS

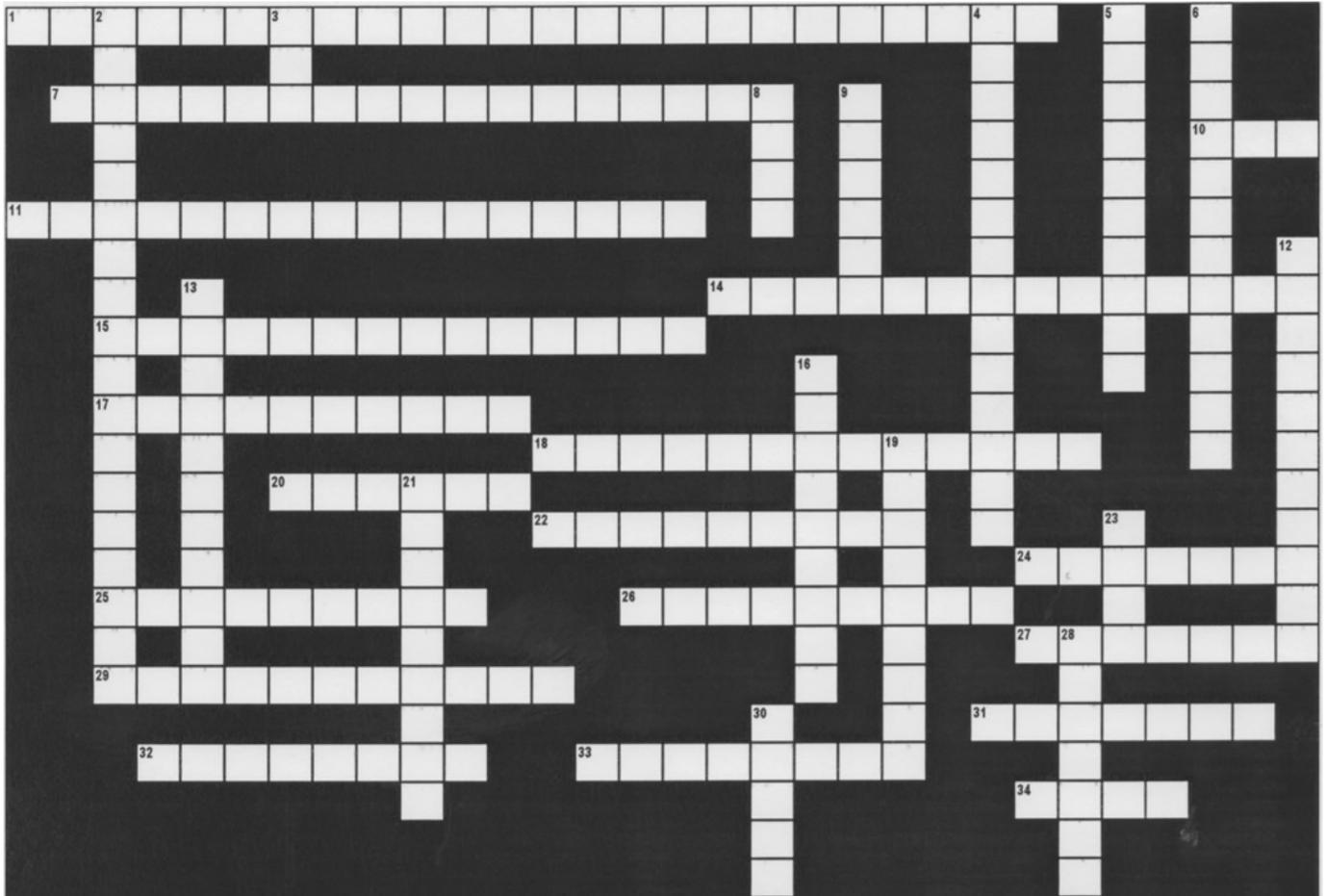
1. Santilli F, Simeone P, Liani R, Davi G (2015) Platelets and diabetes mellitus. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 120:28-39.
2. Makino A, Dai A, Han Y, Youssef KD, Wang W, Donthamsetty R, Scott BT, Wang H, Dillmann WH (2015) O-GlcNAcase overexpression reverses coronary endothelial cell dysfunction in type 1 diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 309:C593-9.
3. Blair P, Flaumenhaft R (2009) Platelet alpha granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 23:177-89.
4. Semple W, Italiano JE, Freedman J (2011) Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11:264-74.
5. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Becker RC (2009) Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost* 7:1759-66.
6. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X (2010) Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:2341-9.
7. Estevez B, Du X (2017) New concepts and mechanisms of platelet activation signaling. *Physiology (Bethesda)* 32:162-177.
8. Kubisz P, Stanciakova L, Stasko J, Galajda P, Mokan M (2015) Endothelial and platelet markers in diabetes mellitus type 2. *World J Diabetes* 6:423-31.
9. Lippi G, Salvagno GL, Nouvenne A, Meschi T, Borghi L, Targher G (2015) The mean platelet volume is significantly associated with higher glycosylated hemoglobin in a large population of unselected outpatients. *Prim Care Diabetes* 9:226-30.
10. Verdoia M, Schaffer A, Barbieri L, Casetti E, Nardin M, Bellomo G, Marino P, Sinigaglia F, De Luca G; Novara Artherosclerosis Study (NAS) group (2014) Diabetes, glucose control and mean platelet volume: a single-centre cohort study. *Diabetes Res Clin Pract* 104:288-94.
11. Keating FK, Sobel BE, Schneider DJ (2003) Effects of increased concentrations of glucose on platelet reactivity in healthy subjects and in patients with and without diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 92:1362-5.
12. Sudic D, Razmara M, Forslund M, Ji Q, Hjemdahl P, Li N (2006) High glucose levels enhance platelet activation: involvement of multiple mechanisms. *Br J Haematol* 133:315-22.
13. Gresele P, Guglielmini G, De Angelis M, Ciferri S, Ciofetta M, Falcinelli E, Lalli C, Ciabattini G, Davi G, Bolli GB (2003) Acute, short-term hyperglycemia enhances shear stress-induced platelet activation in patient with type II diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 41:1013-20.
14. Liu D, Maier A, Scholze A, Rauch U, Boltzen U, Zhao Z, Zhu Z, Tepel M (2008) High glucose enhances transient receptor potential channel canonical type 6-dependent calcium influx in human platelets via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:746-51.
15. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M (2001) Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 50:1491-4.
16. Siewiera K, Kassassir H, Talar M, Wieteska L, Watala C (2016) Long-term untreated streptozotocin-diabetes leads to increased expression and elevated activity of prostaglandin H2 synthase in blood platelets. *Platelets* 27:203-11.
17. Carnevale R, Iuliano L, Nocella C, Bartimoccia S, Trape S, Russo R, Gentile MC, Cangemi R, Loffredo L, Pignatelli P, Viola F; IPINET Group (2013) Relationship between platelet and urinary 8-Iso-PGF2 α levels in subjects with different degrees of NOX2 regulation. *J Am Heart Assoc* 2:e000198.
18. Minuz P, Andrioli G, Degan M, Gaino S, Ortolani R, Tommasoli R, Zuliani V, Lechi A, Lechi C (1998) The F2-isoprostane 8-epi-prostaglandin F2 α increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1248-56.
19. Tang WH, Stitham J, Gleim S, Di Febbo C, Porreca E, Fava C, Tacconelli S, Capone M, Evangelista V, Levantesi G, Wen L, Martin K, Minuz P, Rade J, Patrignani P, Hwa J (2011) Glucose and collagen regulate human platelet activity through aldose reductase induction of thromboxane. *J Clin Invest* 121:4462-76.
20. Massucco P, Mattiello L, Russo I, Traversa M, Doronzo G, Anfossi G, Trovati M (2005) High glucose rapidly activates the nitric oxide/cyclic nucleotide pathway in human platelets via an osmotic mechanism. *Thromb Haemost* 93:517-26.

21. Duan X, Zhan Q, Song B, Zeng S, Zhou J, Long Y (2014) Detection of platelet microRNA expression in patients with diabetes mellitus with or without ischemic stroke. *J Diabetes Complications* 28:705-10.
22. Yang S, Zhao J, Chen Y, Lei M (2016) Biomarkers associated with ischemic stroke in diabetes mellitus patients. *Cardiovasc Toxicol* 16:213-22.
23. Fejes Z, Póliska S, Czimmerer Z, Káplár M, Penyige A, Gál Szabó G, Beke Debreceni I, Kunapuli SP, Kappelmayer J, Nagy B Jr (2017) Hyperglycaemia suppresses micro RNA expression in platelets to increases P2RY12 and SELP levels in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 117:529-42.
24. Undas A, Wiek I, Stepien E, Zmudka K, Tracz W (2008) Hyperglycemia is associated with enhanced thrombin formation, platelet activation, and fibrin clot resistance to lysis in patients with acute coronary syndrome. *Diabetes Care* 31:1590-5.
25. Wang Y, Jobe SM, Ding X, Choo H, Archer DR, Mi R, Ju T, Cummings RD (2012) Platelet biogenesis and functions require correct protein O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:16143-8.
26. Bond MR, Hanover JA (2015) A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol* 208:869-80.
27. Kebede M, Ferdaoussi M, Mancini A, Alquier T, Kulkarni RN, Walker MD, Poitout V (2012) Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:2376-81.
28. Alejandro EU, Bozadjieva N, Kumusoglu D, Abdulhamid S, Levine H, Haataja L, Vadrevu S, Satin LS, Arvan P, Bernal-Mizrachi E (2015) Disruption of O-linked N-acetylglucosamine signaling induces ER stress and β cell failure. *Cell Rep* 13:2527-38.
29. D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A, Ranalli M, Del Guerra S, Lauro D, Del Prato S, Marchetti P, Lauro R, Sesti G (2004) Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J* 18:959-61.
30. Beleznai T, Bagi Z (2012) Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. *Vasc Pharmacol* 56: 115-21.
31. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* 106:466-72.
32. Crawford GL, Hart GW, Whiteheart SW (2008) Murine platelets are not regulated by O-linked beta-N-acetylglucosamine. *Arch Biochem Biophys* 474:220-4.
33. Ferreira IA, Eybrechts KL, Mocking AI, Kroner C, Akkerman JW (2004) IRS-1 mediates inhibition of Ca²⁺ mobilization by insulin via the inhibitory G-protein Gi. *J Biol Chem* 279:3254-64.

CRUCIBIOQ®

*CICLO DE KREBS

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@bq.unam.mx



HORIZONTALES

- 1** Aceptor de hidrógenos provenientes del succinato.
- 7** Presente en la coenzima A, su grupo SH forma un enlace tioéster con el acetato.
- 10** Número de moléculas de dióxido de carbono que se desprende del ciclo de Krebs.
- 11** Reacción de pérdida de dióxido de carbono.
- 14** Enzima que transfiere un grupo fosfato del GTP al ADP.
- 15** Ácido que se forma por la condensación entre oxalacetato y acetil Coenzima A.
- 17** Sustrato de una enzima reguladora que se activa con ADP y requiere de Mg^{++} o Mn^{++} .
- 18** Se oxida por un complejo multienzimático, una de sus unidades contiene lipoato.
- 20** Sustrato que se oxida por la malato deshidrogenasa, depende de NAD^{+} .
- 22** Al oxidarse entrega hidrógenos que ingresan a la cadena respiratoria a nivel de la coenzima Q.
- 24** Vitamina necesaria en la carboxilación del piruvato para formar oxalacetato.

- 25** Condiciones en las que tiene que operar el ciclo de Krebs para utilizar NAD^+ y FAD.
- 26** Molécula que se une a la lisina para intercambiar hidrógenos en el complejo piruvato deshidrogenasa.
- 27** Molécula que activada como coenzima A es el principal alimentador de la vía.
- 29** Producto de la enzima piruvato carboxilasa, se condensa con acetyl Coenzima A para formar citrato.
- 31** Nombre del ácido que designa al ciclo donde se oxidan carbohidratos, lípidos y proteínas.
- 32** Molécula que al descarboxilarse irreversiblemente en la matriz mitocondrial forma acetyl Coenzima A.
- 33** Enzima que cataliza la adición *trans* de H^+ y OH^- al fumarato para producir malato.
- 34** Inhibidor de la enzima isocitrato deshidrogenasa.
- 5** Nombre de la deshidrogenasa que cataliza la formación del oxalosuccinato.
- 6** Reacción de acetyl Coenzima A con oxalacetato y es catalizada por la enzima citrato sintasa.
- 8** La velocidad del ciclo de Krebs disminuye cuando la célula tiene un nivel _____ de ATP.
- 9** Número de pares de hidrógeno que se producen el ciclo de Krebs.
- 12** Vitamina que se encuentra presente en la coenzima A.
- 13** Compartimento celular en donde se realiza el ciclo del ácido cítrico o de los ácidos tricarbóxicos.
- 16** Producto de la transaminación del alfa-cetoglutarato.
- 19** Enzima que cataliza tanto la deshidratación del citrato como la hidratación del cis-aconitato.
- 21** Se produce al transaminar el oxalacetato.
- 23** Número total de ATP que en un principio se consideró, que se generaban en una vuelta del ciclo de Krebs.
- 28** Al salir de la mitocondria sirve como modulador alostérico negativo de la fosfofructocinasa.
- 30** Nombre del ciclo que es la vía común para la oxidación de las moléculas combustibles.

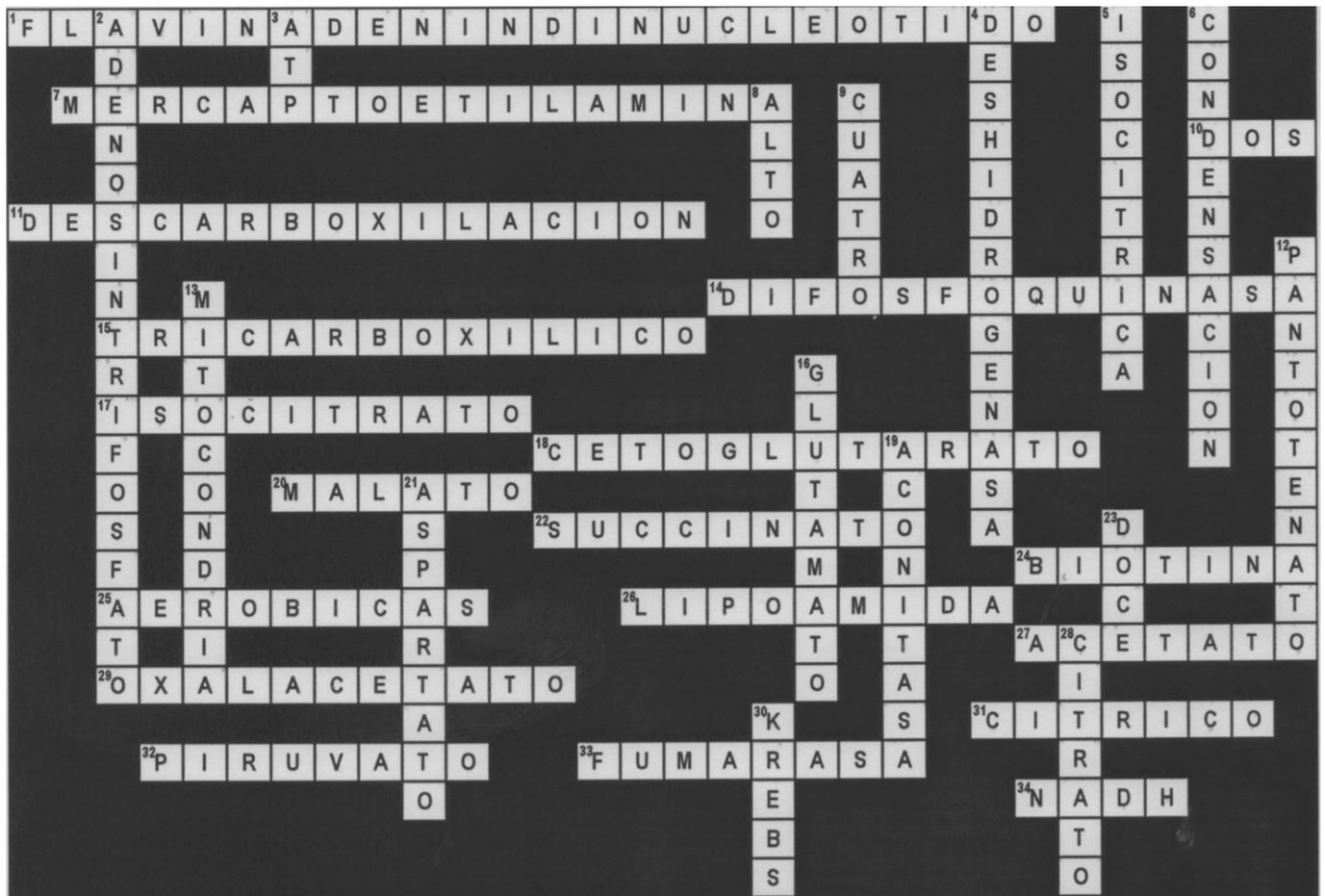
VERTICALES

- 2** La oxidación de los metabolitos del ciclo de Krebs llevan a la formación de la moneda energética.
- 3** Inhibidor alostérico de la enzima citrato sintasa.
- 4** Tipo de enzima que permite que el succinato se oxide a fumarato.
- * Parte del material de este CRUCIBIOQ se publicó el Boletín de Educación Bioquímica (BEB) Vol. 20(3), 2001, ahora se tiene acceso a él en línea.

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ[®]

CICLO DE KREBS

Yolanda Saldaña Balmori
 Correo E: balmori@bq.unam.mx



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

La REB es una revista dedicada a la divulgación, difusión, discusión, análisis y presentación de resultados derivados de investigaciones originales en temas relevantes en el campo de la bioquímica y áreas afines. La Revista está dirigida a investigadores, profesores y estudiantes de posgrado, licenciatura y educación media superior. Los trabajos que se someten a evaluación para su posible publicación no deben de haberse presentado total o parcialmente en otras publicaciones.

Se aceptan únicamente contribuciones originales con estricto contenido científico en forma de artículos de investigación, de revisión, de crítica, de análisis y otras comunicaciones que tengan que ver con diversas formas de estimular el aprendizaje de la bioquímica y sirvan de apoyo a investigadores, profesores y alumnos, tanto en aspectos de investigación, académicos y de actualización.

I. Los artículos se deben ajustar a los siguientes lineamientos editoriales:

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 departamento, institución, ciudad, estado y 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) Resumen. Se deberán incluir dos resúmenes, uno en idioma español y uno en inglés (Abstract) de no más de 350 caracteres.

3) Palabras clave. Se deberá proporcionar de tres a seis palabras clave en idioma español y en inglés.

4) Texto. El artículo deberá ser escrito en el procesador de textos "Word", con una extensión máxima recomendada 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.

5) 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 para los artículos: 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, Ann Arbor, Michigan, USA, 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. 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 pueden presentarse en colores, con fondo y sombreado. Las tablas deben de estar en "Word" sin formatos especiales y 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 después de la reducción. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá darse el crédito correspondiente y en su caso

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 y entre paréntesis (Fig. 2). Las tablas siempre llevarán la primera letra a mayúscula y entre paréntesis (Tabla 2).

7) Abreviaturas. Las abreviaturas seguirán las normas de la IUPAC, aquellas específicas o poco comunes deberán definirse entre paréntesis, la primera vez que se utilicen.

II. Otras comunicaciones incluyen: resúmenes de artículos científicos interesantes, relevantes o significativos, información científica o académica de interés general, avisos de reuniones académicas y cursos, problemas teóricos, ejercicios prácticos, juegos didácticos con orientación educativa, bolsa de trabajo o comentarios de artículos publicados previamente en la REB, cartas al editor, entre otras. Éstas deberán seguir los siguientes lineamientos:

- 1) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 2) Se aceptará un máximo de 10 referencias que se citarán entre paréntesis en el texto, como se indica en el inciso I-5. Se podrán incluir figuras o tablas, 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 lo menos por tres revisores seleccionados por el Comité Editorial a quienes se les enviará el trabajo con los autores en anónimo y quienes en todo momento permanecerán anónimos para los autores y entre

ellos; los revisores opinarán sobre la relevancia del trabajo en un lapso no mayor a un mes. Las correcciones y sugerencias de los revisores serán enviadas con anonimato entre ellos al Editor en Jefe. El resultado de la evaluación puede ser: rechazado, enviado para correcciones o aceptado. Una vez obtenida una evaluación global, el Editor en Jefe enviará las evaluaciones al autor responsable para que corrija e incorpore en el manuscrito las diferentes observaciones o en su caso, indique su opinión a observaciones que considere discutibles en los dictámenes de los revisores. El manuscrito corregido por los autores deberá ser devuelto a la Revista, en un lapso no mayor a 30 días naturales; de otra forma se considerará como un manuscrito enviado por primera vez. De ser necesario el Comité Editorial podrá enviar nuevamente el manuscrito corregido a los revisores para tener una nueva ronda de revisión, todo ello continuando con el anonimato. 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 indicar plenamente su adscripción con teléfono, dirección electrónica y postal para comunicaciones posteriores. En el texto del mensaje enviado se deberá 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. En el mismo texto se debe de aclarar que el trabajo no ha sido enviado a otra revista en su forma total o parcial, para su evaluación o que el mismo está en proceso de publicación en otra revista o en otro tipo de publicación. De igual manera se debe de aclarar que no existe conflicto de intereses entre los autores que envían el trabajo.