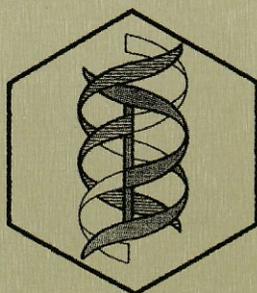


REB 2002

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

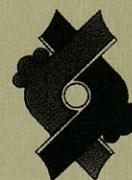


Órgano de información de la
**Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, AC**

Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina,
UNAM



Facultad de Medicina,
UNAM



Sociedad Mexicana de
Bioquímica, AC

EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Vol. 21

No. 3

SEPTIEMBRE 2002

CONTENIDO

EDITORIAL

LA EDUCACIÓN SUPERIOR A DISTANCIA
Jorge Joel Reyes Méndez 163

ARTÍCULOS

LA REVELANCIA DEL RECEPTOR CONOCIDO
COMO EL ANTÍGENO DE SUPERFICIE
CD14 (sCD14) EN LAS RESPUESTAS CELULARES AL
LIPOPOLISACÁRIDO
José Molina López, María Eugenia Torres Márquez
y Alejandro Cravioto 166

ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA SEÑALIZACIÓN
POR RECEPTORES PARA LA PORCIÓN Fc DE LAS
SUBCLASES DE INMUNOGLOBULINA G (FcγRs)
José Agramonte-Hevia y Enrique Ortega 174

LOS MECANISMOS QUE CONTROLAN LA
SÍNTESIS DE PROGESTERONA EN LA
PLACENTA HUMANA
Cecilia García Pérez y Federico Martínez 181

BIOTRANSFORMACIÓN Y EFECTOS SOBRE
EL METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS DEL DDT
Guadalupe Prado Flores, Adolfo Sierra Santoyo,
Ma. de Lourdes López y Arnulfo Albores 190

EJERCICIO FÍSICO AEROBIO Y
LIPEMIA POSPRANDIAL
Rosa Patricia Hernández Torres, Arnulfo Ramos
Jiménez y Marco Antonio Juárez Oropeza 198

EL YIN Y EL YAN DE LA HOMEOSTASIS SANGUÍNEA
Pedro A. Prats y Masiel del Rosario 207

OTRAS COMUNICACIONES

PROBLEMA BIOQUÍMICO
Ricardo Jasso Chávez 214

CRUCIBIOQ
VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO
Yolanda Saldaña Balmori 215

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO
Ricardo Jasso Chávez 217

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
Yolanda Saldaña Balmori 219

CONVOCATORIAS

XXIV CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD
MEXICANA DE BIOQUÍMICA, A.C.
CONVOCATORIA 220

TIP REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS
QUÍMICO-BIOLÓGICAS (CONVOCATORIA) 222

CORRESPONSALES DE LA REVISTA
DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 223

INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DE LA REVISTA
DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 224

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la
Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos PERIÓDICA
(Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias).

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), editada por el Departamento de Bioquímica, Facultad
de Medicina, UNAM, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, CP 04510, México, D.F.
Profesores de Bioquímica, AC, Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Goyocacán, CP 04510, México, D.F.
Certificados de: Línea de Título: 12000; Línea de Contenido: 8297; No. de Expediente: 10122 7715792; Revista al título en
derecho de autor No. 04-2002-03081023200-101.
Diseño: Francisco Alcázar Alvarado. Impreso en los talleres de Editorial Lita, SA de CV, 1er. Rectorio de Condego No. 12,
CP 03720, México, D.F. Tiraje: 1,500 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Rg. No. P909-1001;
UNAM-Departamento de Bioquímica y Facultad de Medicina.

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

COMITÉ EDITORIAL

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

EDITORES

SOCORRO CONCEPCIÓN DURÁN VARGAS
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GRACIELA MEZA RUIZ
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

RAFAEL MORENO SÁNCHEZ
Instituto Nacional de Cardiología
"Dr. Ignacio Chávez"

ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

JORGE JOEL REYES MÉNDEZ
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

ROCÍO SALCEDA SACANELLES
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES ASOCIADOS

MARINA GAVILANES RUIZ
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

ELIZABETH LANGLEY McCARRON
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

ASISTENTE EDITORIAL

MARIVEL ROJAS GARCÍA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

MARÍA DE LOS ANGELES BOFFILL CÁRDENAS
Facultad de Ciencias Médicas
Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba

ALMA LETICIA BORBOA OSUNA
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Sinaloa

JOSÉ CARLOS GARCÍA PIÑEIRO
Instituto de Ciencias Básicas "Victoria de Girón"
Instituto Superior de Ciencias Médicas, La Habana, Cuba

JESÚS RUBÉN GARCILASO PÉREZ
Facultad de Química
Universidad de Sonora

GUADALUPE OLIVA
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros, Tamps.

KATERINA LIRA RUÁN
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor.

MARÍA DEL CARMEN RÍOS DE MOLINA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires, Argentina

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIÓDICA** (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias).

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), editada por el Departamento de Bioquímica, 2o Piso, Edificio D, Facultad de Medicina, UNAM, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, CP 04510. Publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, CP 04510, México, D.F. Certificados de: Licitud de Título: 12000; Licitud de Contenido: 8397; No de Expediente: 1/432 "2"/15792; Reserva al título en derecho de autor No. 04-2002-030616225500-102.

Diseño: Francisco Aldape Alvarado. Impresa en los talleres de Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Correggio No 12, CP 03720, México, DF. Tiraje: 1,500 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg No PP09-1001; UNAM-Departamento de Bioquímica y Facultad de Medicina.

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

EDITORIAL

LA EDUCACIÓN SUPERIOR A DISTANCIA

¿Cuáles son las características esenciales de las estrategias didácticas de la educación superior impartida a través de Internet? Se ha comprobado que la red de redes permite la aparición de modalidades inéditas de educación universitaria; la universidad corporativa, por ejemplo, o los grandes consorcios o conglomerados universitarios, con campus, distribuidos por todo el mundo, que son denominados megauniversidades. O el surgimiento de la universidad de lo cotidiano, de lo inmediato, la universidad comunitaria.

Estas nuevas formas de allegar educación superior a un número cada vez mayor de la población adulta, buscando el logro de objetivos de inserción y desarrollo social y humano cada vez más amplios, y colocando el acento en la relevancia y en la autonomía, están transformando radicalmente al mundo.

Su impacto, ya significativo y ampliamente constatable, está aún, sin embargo, muy lejos de ser pleno. Y seguramente determinará a lo largo de la próxima década una de las más importantes revoluciones culturales jamás registradas en la historia del hombre común, semejante en naturaleza a la de la aparición del libro o a la de la misma universidad.

Pero, ¿Cómo enseñan en la práctica las universidades virtuales? ¿Cuáles son, si las tienen, sus estrategias pedagógicas comunes? ¿Cuál su filosofía educativa? ¿Cuáles sus tácticas estrictamente didácticas?

Tácticas didácticas

La filosofía pedagógica descrita, si bien esencial para la educación universitaria virtual, no representa en modo alguno una excentricidad dentro del pensamiento educativo contemporáneo. Recoge, por el contrario, propósitos comunes que fueron perseguidos por algunas de las más importantes

escuelas pedagógicas. Propósitos, desgraciadamente, que la práctica, las dificultades técnicas y organizativas de su implementación se encargaban de abortar.

Pero si bien la búsqueda de pertinencia, realismo, relevancia, autonomía e inclusión, con estas o con otras palabras, constituyen elementos esenciales del verdadero aprendizaje significativo, los costos y las limitaciones impuestas por la enseñanza presencial y el aislamiento del aula tradicional, hacían, hasta hace poco tiempo, imposible la vinculación efectiva con otras esferas sociales, y limitaban dramáticamente el logro de estos objetivos, aunque maestros y directivos universitarios los comprendieran y los compartieran.

Hoy, esta situación ha cambiado radicalmente, y con las modalidades de educación en línea, la pertinencia, la relevancia, la autonomía y la inclusión, lejos de implicar dificultades al proceso, son co-naturales a él, quedan implicados por él. Lo que resulta muy difícil, es tratar, como algunos hacen por error, de utilizar los enfoques curriculares y las estrategias pedagógicas de la universidad convencional a la universidad virtual. Es posible, pero la deforma, haciéndola perder sus ventajas comparativas.

Educar con éxito, en cualquier nivel, y bajo cualquier modalidad, implica comprender y aceptar las características de la plataforma tecnológica empleada. La educación virtual no es la excepción, pero venturosamente, sus precondicionales técnicas exigen precisamente estrategias que coinciden con las recomendadas mucho tiempo atrás por importantes pensadores.

¿Cuáles son las principales tácticas a seguir para garantizar el logro de las estrategias apuntadas? La mayoría de las universidades virtuales parecen poner acento hacia las siguientes cinco:

- Despertar en el alumno la responsabilidad de la autoformación, en un marco en que el acceso a la información deviene universal y dinámico. En cada tarea debe tratar de reforzarse este proceso. Sin un adecuado desarrollo de autonomía, desde un principio, el aprendizaje virtual pierde sentido. El rol de los tutores o facilitadores debe ser pues muy claro en este sentido, a fin de evitar tratar de convertirse en un maestro convencional a distancia, que vierte su saber sobre alumnos básicamente pasivos.

- Fomentar la participación activa del alumno en los procesos de aprendizaje. Sólo cabe cimentar la responsabilidad de la autoformación, en la medida que se empleen para ello procesos altamente participativos. Esto no sólo significa multiplicar tareas en que el rol activo del estudiante es clave, sino también, en lo posible que esta actividad se refiera a la búsqueda, acopio, transformación, comunicación y organización de información, así como a tareas de vinculación con otras personas o instituciones a través de la Red.

- Incrementar las distintas posibilidades de comunicación entre los protagonistas. La Internet tiene como ventaja toral sobre cualquier otro enfoque didáctico, desde luego, su capacidad para comunicar de modo instantáneo grupos de personas situadas en puntos distantes del planeta. No aprovechar esta ventaja, implicaría desperdiciar quizá su mayor activo. El conocimiento universitario o superior no sólo es un conocimiento de hechos o teorías, sino también un conocimiento de personas. La creación y mantenimiento de relaciones. El conocimiento opera y prospera en red. Esta red puede ser presencial, la que conforman los colegas y los amigos, o distal, por correspondencia, tan empleada desde el Renacimiento, la Edad moderna, la Ilustración y el siglo XIX entre humanistas y científicos, o mediante teléfono.¹ Pero hoy en día la red por excelencia es la Red Global.

- Incrementar el flujo y la calidad de la información por lo que toca a relevancia y utilidad. La Red Global representa flujos y acervos de información de tal volumen, que una incursión poco juiciosa puede

ahogar cualquier proyecto. El aprovechamiento adecuado de estos flujos y acervos exige método. Una cuidadosa mezcla de reglas de búsqueda, con cierto placer por la navegación controlada. Este método al que nos referimos, no es, desde luego, una ciencia exacta, sino más bien un arte, una aproximación heurística, que sólo se adquiere con la práctica. Por lo que debe ponerse en juego desde un principio del proceso de aprendizaje en línea. Sin relevancia ni utilidad, la navegación en la Red genera naufragios.

- Favorecer los procesos de evaluación continua, que deben tener, desde luego, un componente principal de auto-evaluación.

Desafíos para la enseñanza en la Red

Bajo estas perspectivas, y enfocando nuestra atención hacia el estudiante distal ¿cuáles son los desafíos fundamentales que nos plantea la enseñanza superior en la Red? ¿en qué se diferencia de la mera colocación de materiales informativos en la Web? ¿a qué objetivos de impacto² se dirige? A continuación se presentan algunos de los que la naciente literatura sobre la práctica de la universidad virtual ha enfatizado:

- **Modificar las estructuras del pensamiento.** Éste representa, desde luego, uno de los propósitos esenciales de todo proceso educativo auténtico. A menos que se pueda considerar aprendizaje la mera memorización de datos, la educación implica cambio en estas estructuras, o si se quiere, en estas estrategias cognitivas, en las maneras como aproximamos y resolvemos problemas. Pasar del razonamiento por analogía o pensamiento mágico al razonamiento lógico, pasar del pensamiento lineal al sistémico, pasar del pensamiento único a las aproximaciones polivalentes, y pasar de la pasividad receptiva al pensamiento crítico y creativo son condiciones esenciales del cambio a que nos referimos.

- **Considerar al estudiante como sujeto activo.** Más allá del enfoque de la tabula rasa que contemplaba al alumno como una pizarra limpia en que el maestro escribía el conocimiento, casi todas las corrientes

¹ Para Kropotkin, por ejemplo, el telégrafo y el teléfono representaban en potencia una extraordinaria oportunidad de ampliación de las redes de colaboración científica internacional, que aceleraría en forma dramática el progreso de la ciencia y la tecnología.

² Es decir de trascendencia pedagógica.

pedagógicas rescatan el valor de la participación de los estudiantes. En esto la universidad virtual no es la excepción. Ahora bien, en el salón de clases la participación se limita a sesiones de preguntas o discusión, en que cada participante sólo dispone de muy pocos minutos. El rol normal del estudiante en clase es escuchar. Escuchar al maestro o escuchar a otros alumnos. En la enseñanza en línea, la actividad y buena parte de la iniciativa pasan, por necesidad, principalmente al estudiante.

• **Aprender por medio de descubrimiento personal.** Todo verdadero aprendizaje involucra un proceso afectivo vinculado al descubrir. Una mezcla de sorpresa y satisfacción caracterizan la aprehensión de conocimientos así como una cierta predisposición para con lo nuevo. Para aprender en realidad parece requerirse el involucramiento afectivo del estudiante, la existencia de interés previo, pocas respuestas tienen sentido, si antes no se ha formulado una pregunta. Como parte de un paradigma educativo impulsado desde los años cincuenta por el destacado matemático húngaro Georgy Polya, se asume la conveniencia de que el proceso educativo se plantee como finalidad convertir a cada estudiante en un investigador científico práctico. En alguien capaz de plantearse y conducir una investigación, es decir, una indagación cualquiera, sobre algún aspecto de la realidad. Alguien que se formula continuamente preguntas sobre su entorno. Alguien con hábito y sed de descubrimientos personales. Para la educación a través de la Red, no hay, en realidad, alternativa, la única estrategia disponible para el aprendizaje es la del descubrimiento personal.

• **Aprendizaje significativo.** Se reconoce que mucho de lo "aprendido" por los medios educativos tradicionales carece de efectos sobre la forma en que

el estudiante encara en la práctica la solución de problemas. Aun si es capaz de aprobar un examen sobre determinado tópico, se muestra incapaz de discriminar cuando resultaría aplicable este conocimiento en la vida cotidiana. Se registra así un divorcio entre los conocimientos escolares que sirven sobre todo para aprobar exámenes, y los conocimientos que se refieren al mundo. No es sino con la gradual práctica profesional que este estudiante comienza a tender los puentes de significado entre lo aprendido y el mundo. Con la enseñanza en la Red, el aprendizaje significativo rompe este proceso bietápico, permitiendo que, desde un principio, lo aprendido se refiera al mundo.

• **Favorecer el re-encuadramiento o cambio conceptual.** La cosmovisión o el Weltanschauung de cada uno de nosotros, nuestra imagen del mundo, en ocasiones limita lo que somos capaces de entender y de aprender, y es necesario modificarlo para poder seguir aprendiendo. Este cambio, que algunos denominan re-encuadramiento conceptual, implica variaciones a menudo súbitas de nuestra visión de las cosas. La capacidad de ver las cosas de otro modo, desde otra perspectiva. En la medida en que el aprendizaje está contenido desde una escuela del pensamiento, o desde unos pocos documentos, la cosmovisión es más estrecha y rígida. En la medida en que se basa en una multiplicidad de enfoques provenientes de perspectivas no sólo diferentes, sino incluso opuestas, tiende a ser más amplia y más proclive al cambio. Más adaptable. Este es, por supuesto, el caso de la educación en línea.

Jorge Joel Reyes Méndez
Departamento de Atención a la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

LA RELEVANCIA DEL RECEPTOR CONOCIDO COMO EL ANTÍGENO DE SUPERFICIE CD14 (sCD14) EN LAS RESPUESTAS CELULARES AL LIPOPOLISACÁRIDO*

José Molina López¹, María Eugenia Torres Márquez² y Alejandro Cravioto³

RESUMEN

El lipopolisacárido (LPS) es un potente inmunorregulador y es el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas. El LPS está involucrado en la producción de interleucinas, prostaglandinas y de los factores de necrosis tumoral y factor activador de plaquetas. Dichas citocinas participan en la septicemia, secundaria a la infección por bacterias Gramnegativas. Para activar señales intracelulares, el LPS necesita de la existencia de receptores conocidos como el antígeno de superficie CD14 que se presenta tanto en la forma soluble (sCD14) como asociado a la membrana (mCD14), así como del recientemente identificado correceptor transmembranal llamado receptor semejante a Toll (TLR), encargado de transducir la señal del espacio extracelular al intracelular. En esta revisión se pretende mostrar los conocimientos actuales sobre los efectos del lipopolisacárido en diferentes líneas celulares (células epiteliales, endoteliales y células del sistema inmune) y su asociación con el síndrome septicémico causado por bacterias Gramnegativas.

PALABRAS CLAVE: Interleucinas, septicemia, bacterias Gramnegativas, macrófagos.

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS) is a modulator of the immune response, and it is the main component of the outer surface of Gramnegative bacteria. LPS is involved in the production of interleukins, tumor necrosis factor, prostaglandins and platelet activating factor. Depending of the cell type LPS needs one of two forms of CD14 receptors, the plasma membrane associated receptor mCD14 or the soluble receptor sCD14. In addition, LPS needs a transmembrane receptor Toll Like Receptor (TLR), in order to induce cellular signaling. The aim of this review is to update the information about the effects of the LPS in different cell types and its role within the septicemic syndrome caused by Gramnegative bacteria.

KEY WORDS: Interleukins, septicemic syndrome, Gramnegative bacteria, macrophages

INTRODUCCIÓN

El lipopolisacárido (LPS) es una molécula que forma parte de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas y es un potente estimulador de la producción de citocinas por las células del sistema inmune, incluyendo monocitos/macrófagos, linfocitos B y polimorfonucleares, así como de otras estirpes celulares tales como fibroblastos, células epiteliales, endoteliales y

astrocitos. Dichas células responden al LPS produciendo una amplia variedad de mediadores inmunológicos que dan como resultado el choque séptico (1).

Mientras que las vías de activación y señalización de macrófagos mediadas por LPS han sido estudiadas intensamente en los últimos 15 años, los mecanismos de interacción y activación de las células endoteliales por el LPS, apenas se han ini-

ciado. El endotelio vascular en virtud de su posición estratégica entre la sangre y los tejidos, está involucrado en una gran variedad de respuestas, tanto a estímulos fisiológicos como fisiopatológicos (1).

Actualmente se reconoce al endotelio vascular como un blanco crítico para la acción del LPS y de algunas citocinas (2). El endotelio vascular tienen una función importante en la patogénesis del choque

*Recibido: 11 de diciembre de 2001. Aceptado: 11 de junio de 2002.

¹Departamento de Salud Pública y ²Depto. de Bioquímica, ³Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad Universitaria, C. P. 04510, México, D.F. Tel.: 5622-0831. Correo E: joseml@servidor.unam.mx

endotóxico y en el daño a la barrera hematoencefálica en la meningitis causada por bacterias Gramnegativas. Las principales complicaciones vasculares del choque séptico como la hipotensión y la coagulación intravascular diseminada están relacionadas con la activación y la lesión del endotelio vascular inducida por LPS (2). Aunque no se puede distinguir claramente entre una lesión (aumento de la permeabilidad vascular) y una activación (producción de citocinas inflamatorias), las funciones observadas en una célula endotelial activada pueden conducir a lesión endotelial a través de mecanismos indirectos

(3). Una vez activadas, las células endoteliales liberan citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y factor activador de plaquetas) y expresan moléculas de adhesión (E-selectina y moléculas de adhesión intercelular) que están involucradas en el reclutamiento y activación de leucocitos (4).

Varias líneas de investigación sugieren que las células endoteliales responden al LPS de manera dependiente de la dosis. Parece que el suero es indispensable para la activación endotelial mediada por LPS, ya que potencia la expresión de citocinas y de mediadores de adhesión en respuesta al LPS. La pre-

sencia de suero durante la activación endotelial, disminuye la concentración de LPS requerida para la activación en más de 100 veces (5). Algunos estudios confirman que las respuestas al LPS por células endoteliales son dependientes de suero (6).

El LPS o endotoxina es un componente de bacterias Gramnegativas cuyo papel en la patogénesis bacteriana se ha estudiado extensamente. El LPS está compuesto de tres estructuras químicamente diferentes. La primera está formada por unidades repetitivas e hidrofílicas de polisacáridos que forman el núcleo de la molécula (core), la segunda está

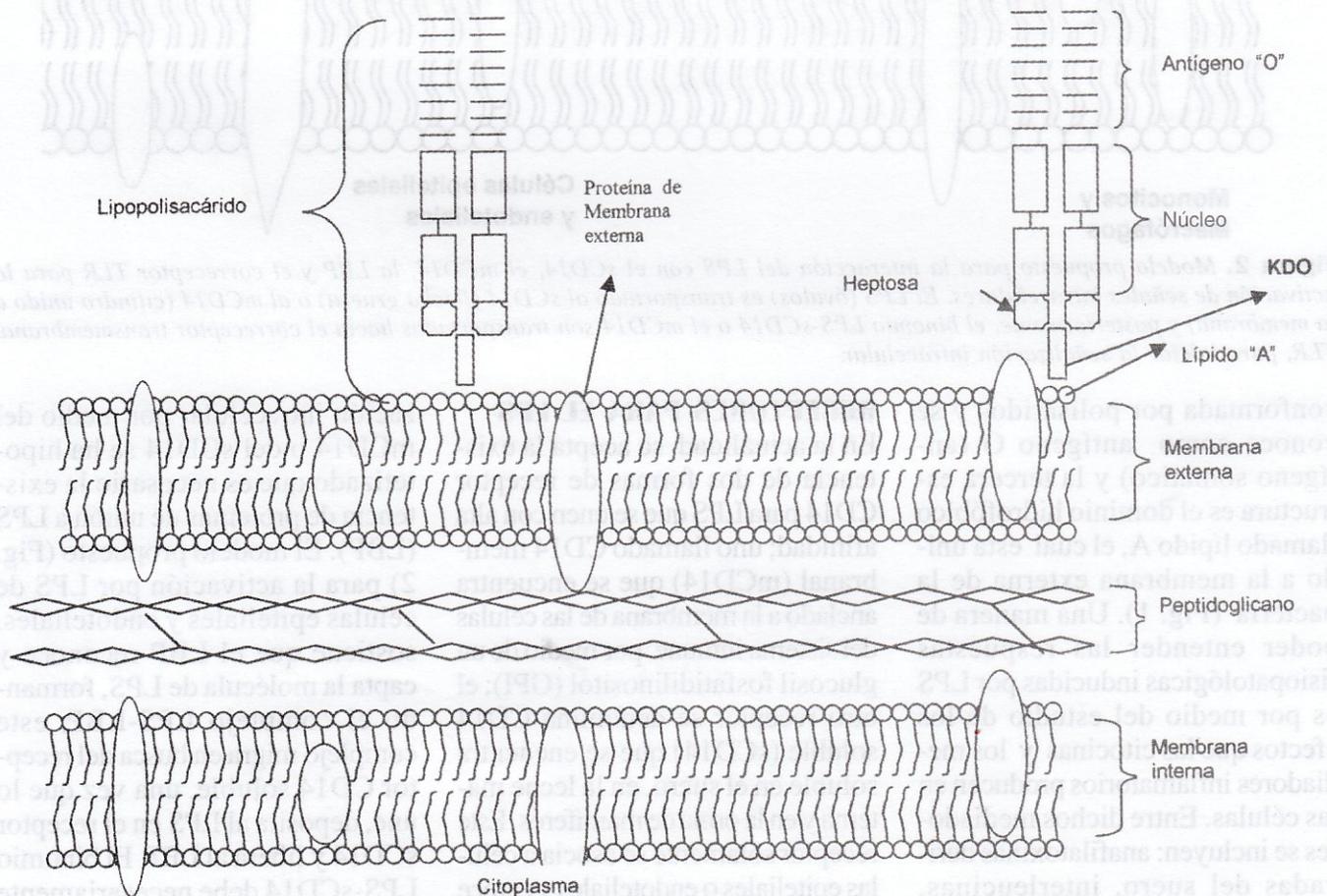


Figura 1. Componentes estructurales de una bacteria Gramnegativa, resaltando las partes que integran al LPS, el cual está formado por tres regiones: la más distal e hidrofílica es el polisacárido antigénico "O", la porción más próxima e hidrofóbica es el lípido "A" que nace de la membrana externa, la otra porción se encuentra uniendo a las dos anteriores y se conoce como núcleo y también es un polisacárido. El lípido A está compuesto de seis a siete ácidos grasos saturados de 16 a 18 carbonos.

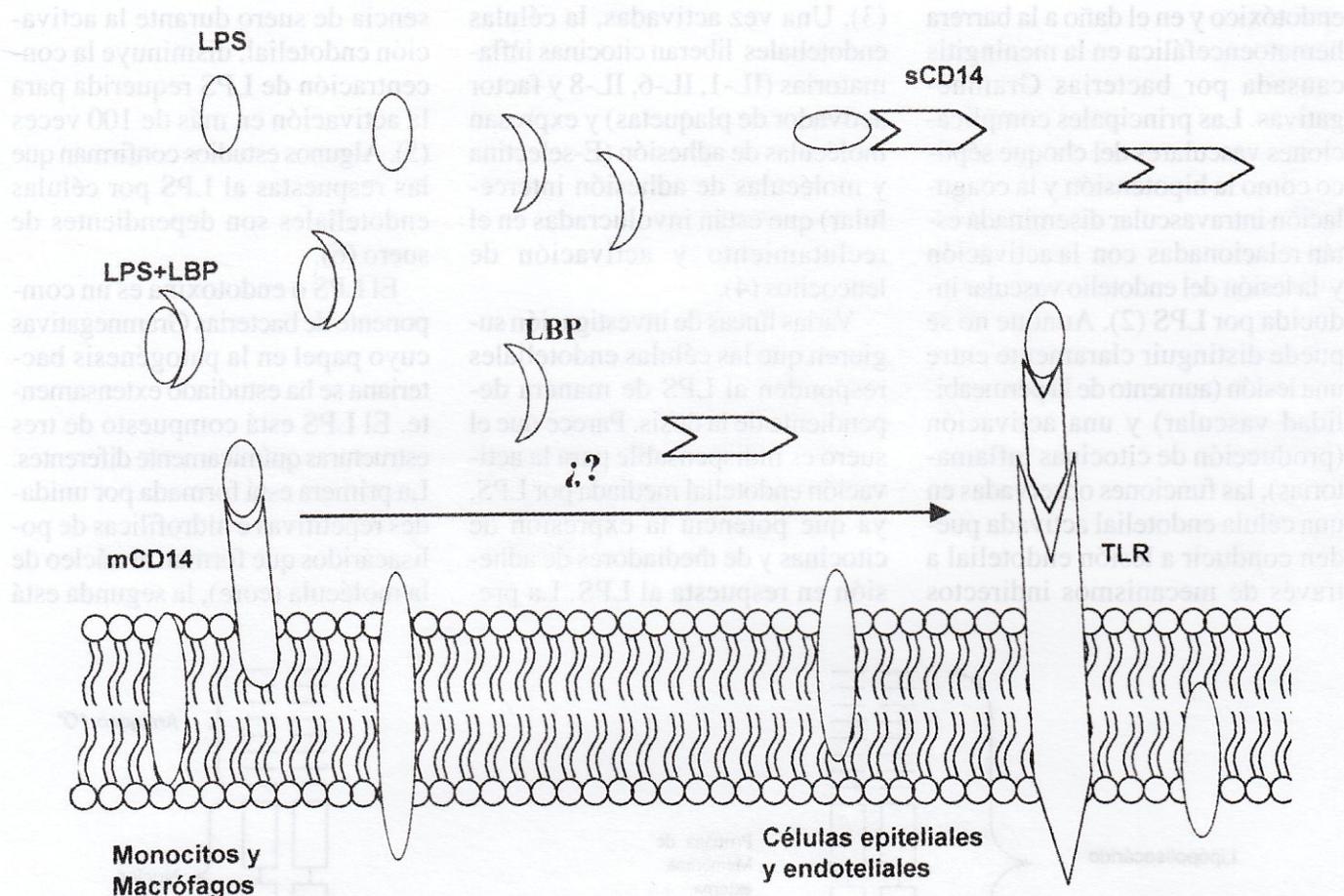


Figura 2. Modelo propuesto para la interacción del LPS con el sCD14, el mCD14, la LBP y el correceptor TLR para la activación de señales intracelulares. El LPS (óvalos) es transportado al sCD14 (flecha gruesa) o al mCD14 (cilindro unido a la membrana) y posteriormente, el binomio LPS-sCD14 o el mCD14 son transportados hacia el correceptor transmembranal TLR, para iniciar la señalización intracelular.

conformada por polisáridos y se conoce como antígeno O (antígeno somático) y la tercera estructura es el dominio hidrofóbico llamado lípido A, el cual está unido a la membrana externa de la bacteria (Fig. 1). Una manera de poder entender las respuestas fisiopatológicas inducidas por LPS es por medio del estudio de los efectos que las citocinas y los mediadores inflamatorios producen en las células. Entre dichos mediadores se incluyen: anafilatoxinas derivadas del suero, interleucinas, leucotrienos, prostaglandinas, factor activador de plaquetas, factor de necrosis tumoral (caquectina) e interferón (7).

RECEPTORES PARA EL LPS

En la actualidad, se acepta la existencia de dos formas de receptor CD14 para LPS que se unen con alta afinidad; uno llamado CD14 membranar (mCD14) que se encuentra anclado a la membrana de las células del sistema inmune, por medio de un glucosil fosfatidilinositol (GPI); el otro receptor se denomina CD14 soluble (sCD14) que se encuentra soluble en el suero, en la leche materna y en la orina de mamíferos. Este receptor solamente se asocia a células epiteliales o endoteliales y carece de proteínas que lo fijen a la membrana de dichas células (8).

Para explicar la manera en que el LPS activa diferentes vías de señalización intracelular por medio del mCD14 o del sCD14 se ha hipotetizado que es necesario la existencia de proteínas de unión a LPS (LBP). El modelo propuesto (Fig. 2) para la activación por LPS de células epiteliales y endoteliales, sostiene que el LBP reconoce y capta la molécula de LPS, formando el complejo LPS-LBP, este complejo migra en busca del receptor CD14 soluble, una vez que lo une, deposita al LPS en el receptor sCD14 y libera al LBP. El binomio LPS-sCD14 debe necesariamente unirse a un receptor transmembranar Toll, que finalmente activaría algunas vías de señalización (Fig. 2) (9).

zación intracelular por medio del mCD14 o del sCD14 se ha hipotetizado que es necesario la existencia de proteínas de unión a LPS (LBP). El modelo propuesto (Fig. 2) para la activación por LPS de células epiteliales y endoteliales, sostiene que el LBP reconoce y capta la molécula de LPS, formando el complejo LPS-LBP, este complejo migra en busca del receptor CD14 soluble, una vez que lo une, deposita al LPS en el receptor sCD14 y libera al LBP. El binomio LPS-sCD14 debe necesariamente unirse a un receptor transmembranar Toll, que finalmente activaría algunas vías de señalización (Fig. 2) (9).

PROTEÍNAS DE UNIÓN AL LPS (LBPs)

Se conocen hasta la fecha cuatro proteínas de unión al LPS que se encuentran en el suero de mamíferos durante la respuesta de fase aguda de la inflamación, una de ellas es LBP, la cual es una glicoproteína de 60 kDa que se une a LPS de cepas bacterianas rugosas o lisas, vía lípido A. Tobias y cols. (7) reportaron que la LBP comparte homología en la secuencia de aminoácidos con otra proteína denominada proteína que aumenta la permeabilidad y la actividad bactericida (BPI).

LBP y BPI también muestran homología en la secuencia de aminoácidos de dos proteínas, una es la proteína que transfiere ésteres de colesterol (CETPs) y la otra es la proteína de transferencia de fosfolípidos (FTPs). Estas proteínas (LBP y BPI) acarrean al LPS hacia su receptor mCD14 o sCD14 (7).

Mientras que las vías dependientes de LBP-LPS están ligadas a la activación de la respuesta al LPS en células que portan mCD14, las células que no expresan dicho receptor anclado a su membrana, como las células endoteliales, epiteliales, dendríticas y astrocitos, responden al LPS, pero solamente en presencia de suero en donde se encuentra el sCD14. Una vez activadas las células carentes del mCD14, secretan citocinas inflamatorias, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico, así como moduladores de la coagulación (10).

EL CD14 SOLUBLE (sCD14)

El receptor sCD14 se ha detectado en la orina y en suero de individuos normales. En el suero de personas no infectadas, el sCD14 se encuentra a una concentración que varía de acuerdo a los investigadores de 3.5

a 4 µg/ml e incrementa hasta 100 veces en algunas enfermedades, como por ejemplo el síndrome respiratorio agudo, peritonitis y meningitis bacteriana. El sCD14 se encuentra en grandes concentraciones en plasma, y corresponde al 99% del total del CD14 contenido en la sangre mientras que el 1% restante se encuentra en la superficie de monocitos.

Se hipotetiza que el sCD14 derivó del mCD14 y la función más aceptada para el sCD14 es la de capacitar a las células epiteliales y endoteliales que normalmente no expresan mCD14 para responder a bajas dosis de LPS (11), dichas respuestas incluyen citotoxicidad de células endoteliales activadas por LPS, inducción de moléculas de adhesión, liberación de citocinas, y activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) (9).

El sCD14 se encuentra en dos isoformas (49 y 55 kDa), la de menor peso molecular deriva de la membrana del monocito por rompimiento proteolítico del segmento que porta el GPI y tiene más corto el extremo carboxilo. La molécula de mayor peso se libera directamente de una fuente intracelular, sin estar unido al GPI. Los humanos sanos tienen en el suero solamente la forma con un peso de 49 kDa, los enfermos de choque séptico tienen niveles altos de sCD14 y presentan exclusivamente la isoforma de 55 kDa (8).

Los procesos que regulan la producción de mCD14 o sCD14 están controlados por mediadores desconocidos y tienen diferente cinética. Las células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con la secuencia completa de ADN complementario para CD14 expresan predominantemente mCD14 y en menor cantidad sCD14. Las células

CHO transfectadas con el ADN complementario para la molécula CD14 truncado en los primeros ocho aminoácidos, expresan y liberan mayormente sCD14 y en menor cantidad liberan mCD14. La expresión y liberación de mCD14 y sCD14 depende de citocinas y de una regulación inducida por la bacteria. La citocina producida por las células T ayudadoras tipo 2 (Th2) causa regulación a la baja de sCD14, mientras que el INF-γ, TNF-α y ligandos bacterianos causan regulación a la alta de mCD14 y sCD14 (8).

El sCD14 previene competitivamente la unión de LPS al mCD14. La interacción del LPS con sCD14 o mCD14 es facilitada por la LBP. El complejo trimérico LPS/sCD14/LBP se puede unir a células no mieloides sin inducir activación celular, esto debido a que el complejo sCD14/LPS es subsecuentemente internalizado, lo cual se interpreta como un mecanismo de eliminación del LPS (8).

INTERACCIONES LPS-sCD14

El análisis de la estructura y función del sCD14 ha mostrado que la capacidad de mediar la respuesta inflamatoria inducida por LPS reside en los primeros 152 aminoácidos del extremo amino de esta proteína. Cada molécula de sCD14 se une a una o dos moléculas de LPS en los residuos de 57-64 del extremo amino terminal, su delección produce una proteína mutante que no se une al LPS ni apoya la respuesta de las células al mismo. Por otro lado, las dos terceras partes del extremo carboxilo de sCD14 pueden ser eliminadas sin afectar la unión al LPS ni la respuesta celular (10).

El sCD14 funciona como un coagonista y capacita a las células carentes de mCD14 para que respon-

dan a bajas concentraciones de LPS. El complejo sCD14-LPS resultante, estimula no sólo a las células carentes de mCD14, sino también a las células mieloides que portan el mCD14. Hailman y cols. dieron las siguientes características de la interacción LPS-sCD14: a) el sCD14 recombinante se une al LPS en ausencia de LBP o de otras proteínas; b) la unión de LPS a sCD14 es de baja estequiometría (una o dos moléculas de LPS por cada molécula de sCD14); c) la LBP recombinante no forma complejos ternarios estables con sCD14 ni con LPS, pero acelera la unión del LPS al sCD14 en concentraciones subestequiométricas. La unión de LPS a sCD14 se acelera dramáticamente por el efecto de la LBP, lo que aumenta la respuesta al LPS (11).

Como ya se mencionó antes, el LPS se une al sCD14 en ausencia completa de LBP, además de que el complejo LPS-sCD14 resultante, estimula células endoteliales, neutrófilos y monocitos. No obstante en células no mieloides, usando como ligando una molécula sCD14 radiomarcada, se encontró que en células que no portan el mCD14 (epiteliales, endoteliales y células del músculo liso), requieren tanto de LPS como de LBP para su activación (12).

sCD14 Y CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

Los monocitos y macrófagos juegan un papel central en la respuesta inflamatoria del humano al LPS en términos de la liberación de mediadores pro y antiinflamatorios. Recientemente, se ha mencionado que el sCD14 tiene un papel predominante en la eliminación de la endotoxina por parte de las células endoteliales, células del músculo liso y monocitos de pacientes con hemoglobinuria paroxística noctur-

na (HPN) (13). Por otro lado, Hiki y cols. estudiaron la capacidad de eliminación de endotoxina por parte de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en 15 voluntarios sanos, en 13 pacientes con sepsis y en un paciente con HPN y con sepsis. El experimento consistió en estimular los monocitos aislados de los tres grupos en estudio, con 1 µg/ml de LPS y por diferentes tiempos y finalmente midieron las concentraciones de LPS; encontraron que la expresión de mCD14 se redujo en un 93.6% en voluntarios humanos sanos, en un 50.5% en pacientes con sepsis y en el paciente con HPN sólo se redujo 0.3%. Por otra parte, la capacidad de eliminación de endotoxina por parte de las PBMC no cambió. Sobre la base de éstos resultados, los autores sugieren que la eliminación de LPS por parte de las PBMC se lleva a cabo por dos mecanismos; en individuos sanos, el mCD14 juega el papel más importante en la eliminación del LPS, mientras que en pacientes con sepsis es el sCD14 el encargado de eliminar dicha molécula (13).

El mecanismo por medio del cual se produce sCD14 *in vivo* e *in vitro* todavía no ha sido totalmente aclarado. Algunos autores consideran al sCD14 como un producto de desecho y otros consideran que dicha molécula participa en la regulación a la baja de la producción de pirógenos inducidos por LPS. Sin embargo, el nivel de sCD14 liberado por monocitos humanos *in vivo* correlaciona con otros parámetros de la respuesta inflamatoria y puede ser importante para contribuir en el desarrollo de la sepsis. Rokita y cols. (12) estudiaron la concentración del CD14 liberado por los monocitos humanos, para lo cual midieron los títulos de

sCD14 en cultivos de células mononucleares (CMN) enriquecidas con sobrenadante de monocitos. Dichos estudios confirmaron la liberación de grandes cantidades de sCD14 en el sobrenadante de varios días de cultivo.

Hasday y cols. (14) analizaron la expresión simultánea de mCD14 y sCD14 en macrófagos broncoalveolares humanos (BAM) y en monocitos de sangre periférica (PBMC) y encontraron que la expresión de mCD14 fue similar (9%) tanto en BAM como en PBMC recientemente aislados, mientras que la expresión del sCD14 aumentó en un 19% a las 48 horas de haber retado con 10 ng/ml de LPS a ambos tipos celulares.

El sCD14 se une no solamente al LPS sino también a otros componentes de las bacterias Gramnegativas. A bajas concentraciones (10 a 100 ng/ml), el complejo sCD14-LPS activa células epiteliales, endoteliales y células del músculo liso vascular vía el receptor TLR (15). Por otro lado, con altas dosis (10 µg/ml) el complejo sCD14-LPS puede activar monocitos y leucocitos polimorfonucleares.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES POR LPS EN CÉLULAS EPITELIALES Y ENDOTELIALES

Pugin y cols. (16) mostraron que varias líneas celulares de tipo epitelial y endotelial requieren de la estimulación con LPS y suero para liberar citocinas, sugiriendo que *in vivo* las proteínas LBP y sCD14 (presentes en el suero) contribuyen al síndrome endotóxico secundario al desafío con LPS de las células endoteliales y epiteliales. El complejo LPS-sCD14 activa células epiteliales y endoteliales con la ayuda del receptor transmembranal TLR.

Estudios de Hiki y cols. sobre la función del sCD14 en pacientes con choque séptico, tuvieron como propósito investigar el efecto del sCD14 del suero sobre la producción de interleucina 8 (IL-8) inducida por LPS en células epiteliales. Ellos compararon el suero de pacientes con HPN, que expresan solamente la isoforma de mayor peso molecular, con el de los controles sanos que expresan la isoforma de bajo peso molecular, y a su vez se compararon con el suero de pacientes con sepsis. Los autores utilizaron el modelo de células epiteliales debido a que los fenómenos son más reproducibles que en un cultivo primario (por ejemplo células endoteliales). Los resultados mostraron que el suero de pacientes con sepsis y de controles promovieron la inducción de IL-8 en células SW620 con 100 ng/ml de LPS. Asimismo, la concentración de sCD14 por parte de los monocitos de los pacientes con sepsis y controles sanos disminuyó de 20.1 y 4.5 unidades respectivamente (13).

La hipótesis de Vita y cols. (17) fue que los complejos sCD14-LPS desencadenan la activación celular por medio de una estructura en la superficie celular que media la señalización, para lo cual estudiaron las interacciones de sCD14 con células en presencia y en ausencia de LPS. Ellos encontraron que la unión de ¹²⁵I-sCD14 fue específica y saturable, indicando una interacción típica ligando-receptor para varios tipos de células, incluyendo células endoteliales, epiteliales, astrocitos y monocitos humanos; hubo una unión específica a todos los tipos celulares y la inducción de interleucina 6 (IL-6) en células sin mCD14 sólo fue posible cuando se agregaron juntos el sCD14 y el LPS.

Las células endoteliales y epiteliales juegan un papel importante en la respuesta del hospedero al LPS durante la sepsis. Patrick y cols. (18) fueron los primeros que postularon los mecanismos por medio de los cuales el LPS causa la muerte de las células endoteliales (CE) del cerebro de bovino, dichos mecanismos incluyen a las interacciones del LPS con los componentes del suero y subsecuentemente un daño vía CD14. Posteriormente, demostraron que el anticuerpo humano anti-CD14 bloquea la citotoxicidad inducida por LPS en células de bovino, aún en presencia de suero humano (11). Arditi (1) confirmó estos resultados en células endoteliales de cerebro de bovino, en células de las venas pulmonares y en células endoteliales de la aorta.

Read y cols. (9) estudiando la activación del factor de transcripción nuclear NF-kB por LPS en células endoteliales de la vena umbilical humana que no expresa el mCD14, encontró que las células endoteliales se tornan 300 veces más sensibles a la activación inducida por LPS en presencia de suero, tomando como medida la activación y la expresión de mRNA para dicho factor de transcripción nuclear.

El LPS de cepas lisas y rugosas, así como el lípido A inducen la fosforilación en tirosina de varias proteínas, incluyendo ERK1, ERK2 y la MAP cinasa p38, en células endoteliales de cerebro de humano y de bovino. El pretratamiento de las CE con un inhibidor de cinasas de tirosina, como lo es herbimicina A, inhibió la fosforilación de residuos de tirosinas inducida por LPS, también inhibió la liberación de IL-6 por parte de células endoteliales de los pequeños vasos del cerebro humano (HBMEC) de manera depen-

diente de la dosis. Para investigar el papel del sCD14 en la fosforilación de residuos de tirosina inducida por LPS en HBMEC, los mismos autores incubaron las monocapas celulares con 5% de suero humano con y sin anti-CD14 humano y posteriormente retaron las células con LPS. Los resultados indican un bloqueo en la fosforilación en tirosina inducida por LPS en dichas células (1). Posteriormente, Schumann y cols. (19) encontraron resultados similares en células del endotelio vascular humano.

CONCLUSIONES

El LPS ha cobrado gran importancia en los últimos años, por su asociación con el síndrome de choque séptico y con la coagulación intravascular diseminada, siendo de primordial interés conocer los mecanismos a través de los cuales el LPS interacciona *in vivo* e *in vitro*. Se conocen diferentes receptores para el LPS, de los cuales los más destacados son el mCD14 y el sCD14.

Antes del año de 1997 no se conocían los mecanismos por medio de los cuales las células respondían al LPS, ya que el mCD14 no tiene dominios transmembranal ni citoplasmático que explicara los eventos de señales intracelulares activadas por dicha molécula. Sin embargo, en los últimos años se identificó el receptor transmembranal TLR con lo cual se ha podido explicar parte de las respuestas celulares al LPS.

Actualmente se purifica la molécula sCD14 ya sea del suero, leche materna u orina de personas sanas. Esta molécula junto con TLR permite esclarecer la manera en que se desencadenan las respuestas del hospedero asociadas al proceso infeccioso.

REFERENCIAS

1. Arditi M (1999) Endothelial cell activation by lipopolysaccharide: role of soluble sCD14. En: *Endotoxin in health and disease*. Editors: Brade H, Opal S M, Vogel S N y Morrison C D. Marcel Dekker, New York, USA. pp 423-435.
2. Bone R (1991) Sepsis syndrome. New insights into its pathogenesis and treatment. *Infect Dis Clin North Am* 5:793-805.
3. Pober J S y Cotran R S (1990) Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 90:427-451.
4. Pohlman T H y Harlan J M (1992) Endotoxin-endothelial cells interactions. In: *Endotoxin lipopolysaccharides*. Editores: Morrison D C y Ryan J, Boca Raton, Fl, USA. CRC Press, pp 459-472.
5. Landmann R, Muller B y Zimmerli W (2000) CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes Infection* 2:295-304.
6. Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, Ulevitch R J y Mathison J C (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide and LPS-binding protein. *Science* 249:1431-1433.
7. Tobias P S, Mathison J, Mintz D, Lee J D, Kravchenko V, Kato K, Pugin J y Ulevitch R J (1992) Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:239.
8. Labeta M O, Vidal K, Nores J E, Arias M, Vita N, Morgan B P, Guillemot J C, Loyaux D, Ferrara P, Schmid D, Affolter M, Borysiewicz L K, Donnet-Hughes A y Schiffrin E J (2000) Innate recognition of bacteria in human milk is mediated by a milk-derived highly expressed pattern recognition receptor, soluble CD14. *J Exp Med* 191:1807-1812.
9. Read M A, Cordle S R, Veach R A, Carlisle C D y Hawger J (1993) Cell-free pool of CD14 mediates activation of transcription factor NF- κ B by lipopolysaccharide in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:9887-9891.
10. Juan T S, Hailman E, Kelly J M, Johnson D A, Busse L A, Wright S D y Lichenstein H S (1995) Soluble CD14 truncated at amino acid 152 binds lipopolysaccharide and enable cellular response to LPS. *J Biol Chem* 270:1382-1387.
11. Hailman E, Lechenstein H S, Wurfel M M, Miller D S, Johnson D A, Kelley M, Busse L A, Zukowski M M y Wright S D (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 179:269-277.
12. Rokita E y Menzel E J (1997) Characteristics of CD14 shedding from human monocytes. *APMIS* 105:510-518.
13. Hiki N, Berger D, Prigl C, Boelke E, Wiedeck H, Seidelmann M, Staib L, Kaminishi M, Oohara T y Beger H G (1998) Endotoxin binding and elimination by monocytes: Secretion of soluble CD14 represents an inducible mechanism counteracting reduced expression of membrane CD14 in patients with sepsis and in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Infect Immun* 66:1135-1141.
14. Hasday J D, Dubin W, Mongovin S, Goldblum S E, Swoveland P, Leturca D J, Moriarty A M, Bleecker E R y Martin T R (1997) Bronchoalveolar macrophage CD14 expression: shift between membrane-associated and soluble pools. *Am J Physiol-Lung C* 272:L925-L933.
15. Beutler B (2000) Tlr-4 component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 12:20-26.
16. Pugin J, Schurer-Maly C C, Letircq D, Moriarty A, Ulevitch R J y Tobias P S (1993) Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:2744-2748.
17. Vita N, Lefort S, Sozzani P, Reeb R, Richards S, Borysiewicz L K, Ferrara P y Labeta M O (1997) Detection and biochemical characterization of the receptor for complexes of soluble CD14 and

bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 158:3457-3462.

18. Patrick D, Betts J, Frey E A, Prameya R, Dorovini-Zis K y Finley B B (1992) Haemophilus influenzae lipopolysaccharide disrupts confluent monolayers of bovine brain endothelial cells via a serum-dependent cytotoxic pathway. *J Infect Dis* 165:865-872.

19. Schumann R R, Pfeil D, Lamping N, Kirschning C, Scherzinger G, Schlag P, Karawajew L y Herrmann F (1996) Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases erk-1 and p38 in culture human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14. *Blood* 87:2805-2814.

PALABRAS CLAVE: receptor Fc gamma 1, TLR-2, activación, fosforilación en residuos de tirosina

RESUMEN: El receptor para la porción Fc de las inmunoglobulinas G (Fc gamma 1) constituye el enlace crucial entre la respuesta inmune humoral y la célula. La agregación de los Fc gamma 1 media respuestas celulares tales como: fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), transcripción de genes de estrés y liberación de factores con actividad promitótica. En la mayoría de las células hematopoyéticas se expresan más de una isoforma de los receptores Fc gamma 1. Los Fc gamma 1 pueden activar y Fc gamma 1 que están ligados a la activación. Los complejos moleculares de señalización de transducción de señales involucran por cada isoforma de receptor de anticuerpo Fc gamma 1. El entendimiento de los mecanismos de acción de los receptores de anticuerpo Fc gamma 1 puede proporcionar información sobre los mecanismos de acción de los receptores de anticuerpo Fc gamma 1.

KEY WORDS: Fc receptor, TLR-2, activation, tyrosine residue phosphorylation

RESUMEN

Los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas G (Fc gamma 1) constituyen el enlace crucial entre la respuesta inmune humoral y la célula. La agregación de los Fc gamma 1 media respuestas celulares tales como: fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), transcripción de genes de estrés y liberación de factores con actividad promitótica. En la mayoría de las células hematopoyéticas se expresan más de una isoforma de los receptores Fc gamma 1. Los Fc gamma 1 pueden activar y Fc gamma 1 que están ligados a la activación. Los complejos moleculares de señalización de transducción de señales involucran por cada isoforma de receptor de anticuerpo Fc gamma 1. El entendimiento de los mecanismos de acción de los receptores de anticuerpo Fc gamma 1 puede proporcionar información sobre los mecanismos de acción de los receptores de anticuerpo Fc gamma 1.

INTRODUCCIÓN

Los receptores para la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulinas (IgG) (Fc gamma 1) están ampliamente distribuidos en la superficie de células hematopoyéticas y pertenecen a la superfamilia de las immunoglobulinas (1). Los Fc gamma 1 permiten que la inmunidad

humoral se comunique e interactúe con la inmunidad celular. Estos receptores participan en una amplia variedad de funciones de gran importancia para los mecanismos de defensa. Entre estas funciones está la fagocitosis de microorganismos patógenos. Asimismo, los Fc gamma 1 son los encargados de eliminar inmunocomplejos de la circulación, evitando así que un exceso de estos produzca ocasionar daños posteriores al organismo. Por otro lado, estos receptores sirven de puente para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células tumorales o infectadas por virus. Finalmente, a través de ellos, distintas

*Recibido: 23 de noviembre de 2001. Aceptado: 9 de julio de 2002. ¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apartado Postal 70-228, Ciudad Universitaria, C. P. 04510 México, D.F. Tel.: 5622-3834. Fax: 5622-3759. Correo E: agranmont@ yahoo.com

ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA SEÑALIZACIÓN POR RECEPTORES PARA LA PORCIÓN Fc DE LAS SUBCLASES DE INMUNOGLOBULINA G (FcγRs)*

José Agramonte-Hevia y Enrique Ortega¹

RESUMEN

Los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas G (FcγRs) constituyen el enlace crucial entre la respuesta inmune humoral y la celular. La agregación de los FcγRs media respuestas celulares tales como: fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), transcripción de genes de citocinas y liberación de factores con actividad proinflamatoria. En la mayoría de las células hematopoyéticas se expresan más de una isoforma de los receptores FcγR. Hay FcγRs que inducen activación y FcγRs que median inhibición de la activación. Los complejos moleculares de señalización (o de transducción de señales) formados por cada isoforma de receptor Fcγ median la activación de vías bioquímicas diferentes dependiendo del tipo celular y del estado de activación en que se encuentre la célula. Comprender las complejas interacciones moleculares entre receptores Fcγ activadores e inhibidores puede dar la pauta para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades humanas de tipo autoinmune.

PALABRAS CLAVE: receptor Fc, ITAMs, ITIMs, señalización, fosforilación en residuos de tirosina.

ABSTRACT

Receptors for the Fc domain of IgG (FcγRs) provide a crucial link between the humoral and cellular branches of the immune system. Cross-linking of FcγRs leads to functions such as phagocytosis, antibody dependent cell toxicity, cytokine gene transcription and secretion of inflammatory mediators. Hematopoietic cells express more than one isoform of FcγRs. Functionally, there are activating FcγR as well as inhibitory FcγRs. The molecular signaling complexes created by each receptor isoform are responsible for activating different biochemical pathways, depending on the cell type, and also on the stimulation state of the cell. Understanding the complex interactions between activating and inhibitory Fcγ receptors might lead to new therapeutic approaches for human autoimmune diseases.

KEY WORDS: Fc receptor, ITAMs and ITIMs, signaling, tyrosine residue phosphorylation.

INTRODUCCIÓN

Los receptores para la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulinas (anticuerpos) (FcγRs) están ampliamente distribuidos en la superficie de células hematopoyéticas y pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (1). Los FcγRs permiten que la inmunidad

humoral se comunique e interactúe con la inmunidad celular. Estos receptores participan en una amplia variedad de funciones de gran importancia para los mecanismos de defensa. Entre estas funciones está la fagocitosis de microorganismos patógenos. Asimismo, los FcγR son los encargados de eliminar inmuno-

complejos de la circulación, evitando así que un exceso de estos pudiera ocasionar daños posteriores al organismo. Por otro lado, estos receptores sirven de puentes para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células tumorales o infectadas por virus. Finalmente, a través de ellos, distintas

*Recibido: 23 de noviembre de 2001. Aceptado: 9 de julio de 2002.

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apartado Postal 70-228, Ciudad Universitaria, C. P. 04510. México, D.F. Tel.: 5622-3834. Fax: 5622-3369. Correo E: agramonth@yahoo.com.

células son inducidas a liberar factores con actividad proinflamatoria e inmunomoduladora.

TIPOS DE RECEPTORES PARA IgG

Tres clases de receptores para la porción Fc de la IgG (FcγRs) han sido descritos: FcγRI (CD 64) de 72 kDa, FcγRII (CD 32) de 40 kDa y FcγRIII (CD 16) de 50 a 80 kDa de peso molecular (2, 3). Cada clase además, incluye varias isoformas. Los FcγRs existen tanto como receptores de membrana o en forma de moléculas solubles, producidas por corte y empalme alternativo de los transcritos o por proteólisis de los receptores de membrana. Se ha postulado que las formas solubles de los receptores pueden participar en mecanismos de regulación de la concentración

sérica de inmunoglobulinas G. El FcγRI une IgG monomérica con alta afinidad y se ha clasificado como receptor de alta afinidad. Los receptores FcγRII y FcγRIII presentan una menor afinidad por la molécula de IgG monomérica, por lo que solo son capaces de unir inmunocomplejos multiméricos. Del FcγRI se conoce una sola isoforma funcional expresada en membrana. Sin embargo del FcγRIIA, se han descrito dos isoformas (FcγRIIA₁, FcγRIIA₂), del FcγRIIB tres (FcγRIIB₁, FcγRIIB₂ y FcγRIIB₃) y del FcγRIIC hasta cuatro (FcγRIIC₁₋₄). En el caso del FcγRIII se conocen dos isoformas (FcγRIIIA y FcγRIIIB).

1. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LOS FcγRS

Existen tres genes conocidos como

A, B y C que codifican para el FcγRI y el FcγRII y sólo dos genes A y B para el FcγRIII, todos localizados en el brazo largo del cromosoma 1 (1q21.1, 1q23-24 y 1q23-24 respectivamente) (3-5) (Tabla I). Todos los genes codifican para la subunidad α de los receptores (subunidad que interactúa con el ligando) y tienen una organización intrón-exón similar. Dos exones líderes hacia el extremo 5' del gen codifican para un péptido señal que sufre proteólisis en el receptor maduro, en un sitio proteolítico codificado por el segundo exón. Dos o tres exones de cada gen codifican para un dominio extracelular de tipo inmunoglobulina. Un solo exón codifica para el dominio transmembranaral, el citoplasmático y secuencias no traducidas hacia el extremo 3' (5).

TABLA I

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RECEPTORES PARA LA PORCIÓN Fc DE LA IgG HUMANA

Receptor (CD)	Peso molecular (kDa)	Genes (localización cromosómica)	Motivo involucrado en la señalización	Subunidades asociadas	Afinidad por la IgG (K _d)
FcγRI (CD64)	72	FcγRIA FcγRIB FcγRIC (1q21.1)	- - -	γ* ND ND	(10 ⁸ -10 ⁹ M ⁻¹)
FcγRII (CD32)	40	FcγRIIA FcγRIIB FcγRIIC (1q23-24)	ITAM ITIM ITAM	γ - ND	(<10 ⁷ M ⁻¹)
FcγRIII (CD16)	50-80	FcγRIIIA FcγRIIIB (1q23-24)	- -	γ, ζ [†] -	(±3x10 ⁷ M ⁻¹) (<10 ⁷ M ⁻¹)

Abreviaturas:

FcγR, receptor para la porción Fc de la inmunoglobulina G; ITAM, motivo de activación basado en tirosina; ITIM, motivo de inhibición basado en tirosina; ND, no determinado; (-), ausencia.

* subunidad que presenta un motivo ITAM en su estructura.

† subunidad que presenta tres motivos ITAM en su estructura.

(Adaptado de Dijkstra H.M., 2001), Ref. No.13

2. LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN CELULAR

El gen A que codifica para el Fc γ RI da lugar a un receptor transmembranal que contiene una porción extracelular con tres dominios de tipo inmunoglobulina, una porción transmembranal y una citosólica. Los genes B y C dan lugar a receptores que contienen solo dos dominios de tipo inmunoglobulina, estas son formas solubles del receptor que probablemente sean secretadas (6). El Fc γ RI se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos tratados con interferón γ . Los receptores Fc γ RII y Fc γ RIII son moléculas formadas por dos dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina en su porción extracelular, una porción transmembranal y una porción citosólica (excepto para el Fc γ RIIIB, que se encuentra anclado a la membrana celular por glicofosfatidilinositol). El Fc γ RIIA y C están expresados en monocitos, macrófagos, neutrófilos, megacariocitos y plaquetas. Las cuatro isoformas del Fc γ RIIC se han encontrado en células asesinas naturales, células NK (7) y el Fc γ RIIB se expresa fundamentalmente en mastocitos y linfocitos B, aunque también se ha encontrado expresado en monocitos y macrófagos. El Fc γ RIIIA se encuentra en macrófagos, monocitos activados, células NK, linfocitos pre-B y en poblaciones de linfocitos T γ/δ . Es importante destacar que los receptores Fc γ RI y el Fc γ RIIIA se expresan en membrana como complejos de 1 subunidad α (que une al ligando) asociados a dímeros de cadena γ o ζ , sin embargo el Fc γ RII está formado sólo por la subunidad α .

3. SEÑALES BIOQUÍMICAS INDUCIDAS POR LOS Fc γ RS

Aunque estos receptores muestran solapamiento en la capacidad de

unir a las distintas subclases de IgG, las funciones celulares efectoras inducidas a través de ellos pueden ser distintas. Esto está dado porque a pesar de que presentan una alta homología en sus porciones extracelulares, son diferentes en sus porciones citosólicas. Desde un punto de vista funcional los Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC y Fc γ RIIIA son receptores activadores, caracterizados por la presencia de un motivo común identificado en muchas cadenas de receptores para antígenos. Este motivo es conocido como ITAM (*motivo de activación basado en tirosina*) (8, 9). Este consiste de dos pares de residuos de tirosinas y leucinas dentro de una secuencia consenso D/E-X₂-Y-X-X-L-X_{7/13}-Y-X-X-L. Se ha demostrado que estas estructuras son muy importantes para la transducción de la señal bioquímica durante la activación celular. Estos motivos están localizados en el dominio citosólico del receptor Fc γ RIIA o en las cadenas γ o ζ asociadas a los receptores Fc γ RI y Fc γ RIIIA, consideradas como subunidades accesorias involucradas en la señalización. En contraste, el Fc γ RIIB es un receptor inhibidor, ya que en lugar de tener ITAM en su dominio intracelular contiene un ITIM (*motivo de inhibición basado en tirosina*) en sus dominios citosólicos. Este consiste de una secuencia de 13 aminoácidos (AENTITYSLLKHP) y se ha demostrado que la agregación simultánea de receptores que contienen esta secuencia (ITIM) son receptores considerados activadores, como el receptor de antígeno de células B (BCR) causan inhibición de la activación de linfocitos (10).

Los receptores activadores están expresados en plaquetas, monocitos, granulocitos y células

NK, mientras que en linfocitos están expresados sólo en bajos niveles. Sin embargo, los receptores inhibidores damentalmente en linfocitos B, mastocitos y células dendríticas. Los macrófagos expresan ambos tipos de receptores.

RECEPTORES Fc γ ACTIVADORES

La agregación de los receptores Fc en la membrana celular por inmunocomplejos o partículas aponizadas con IgG induce la fosforilación de los residuos de tirosina presentes en los motivos ITAM (para el caso de los receptores Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC y Fc γ RIIIA). Se sabe que proteínas con actividad de cinasa pertenecientes a la familia de las cinasas de residuos de tirosina *Src* (*Src*, *Lyn*) que se encuentran en la vecindad de los receptores inactivos, ancladas a la membrana por residuos aminoácidos de glicina miristoilados o palmitoilados, son las encargadas de fosforilar a los residuos de tirosina presentes en los ITAMs de los tallos citosólicos del Fc γ RIIA y Fc γ RIIC o de las cadenas asociadas al Fc γ RI y el Fc γ RIIIA. Estas cinasas se activan por desfosforilación, y se ha postulado que CD45 es la fosfatasa que realiza esta función en la mayoría de las células hematopoyéticas. Los residuos de tirosina fosforilados se convierten en sitios transitorios de anclaje de proteínas que presentan dominios SH-2 (*dominio homólogo al de la cinasa Src tipo 2*) en su estructura. Estas proteínas al interactuar con los ITAMs fosforilados se activan y (en el caso de las cinasas) comienzan a fosforilar sustratos más abajo en la cascada de señalización o (en el caso de proteínas adaptadoras) colaboran en el ensamblaje del complejo de transducción. En células fagocíticas, la principal proteína que se asocia a los ITAMs

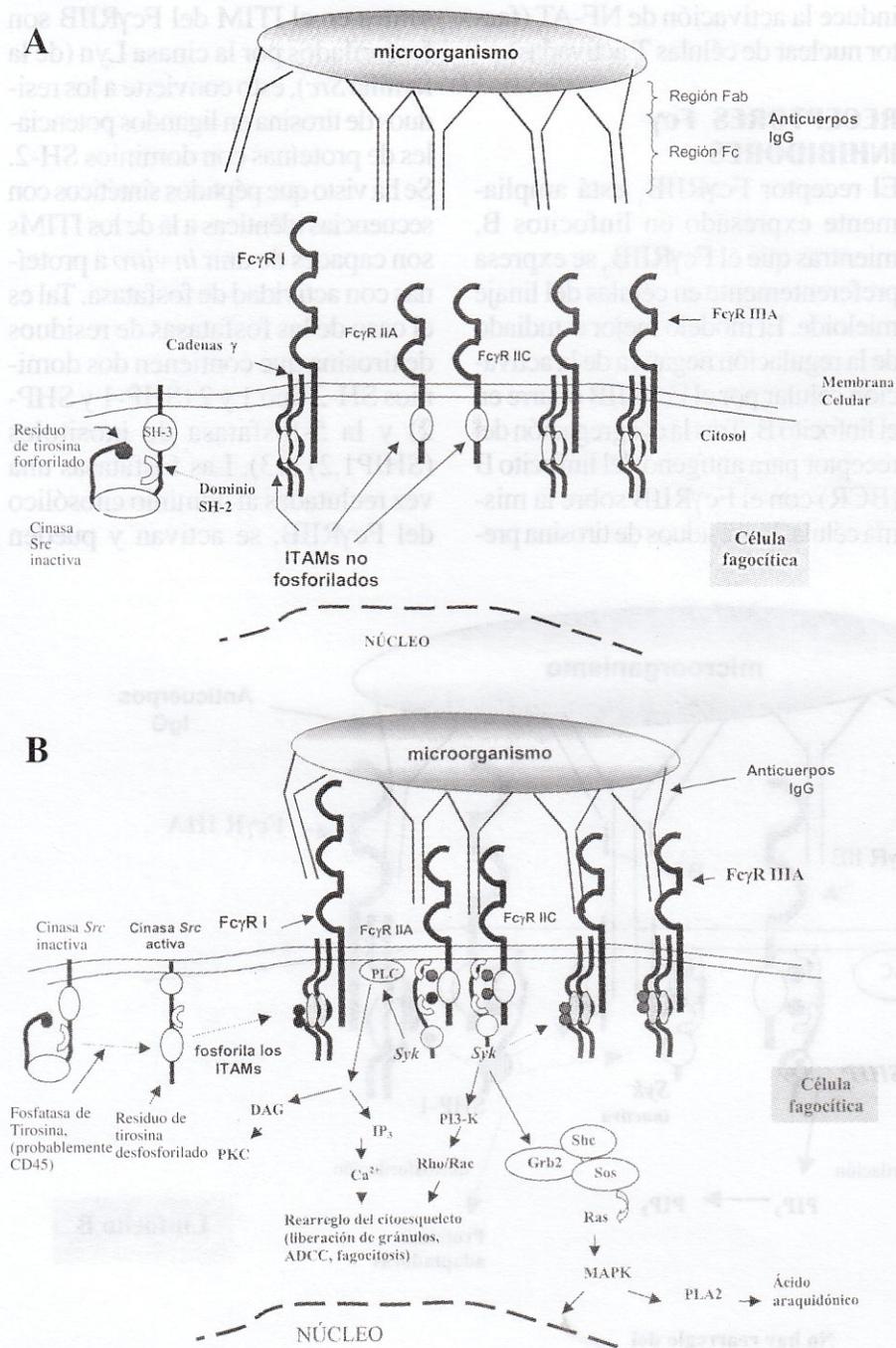


Figura 1. Activación de la fagocitosis a través de los FcγRs. Representación esquemática de los eventos bioquímicos tempranos que se llevan a cabo después de que los receptores FcγR reconocen a la porción Fc de los anticuerpos unidos a microorganismo. (A) En la célula fagocítica en estado de reposo los receptores FcγR se encuentran inactivos. La cinasa Src se encuentra inactiva debido a la formación de un puente intramoleculer establecido entre el residuo de tirosina 527 y su dominio SH-2. (B) La unión de la partícula opsonizada por IgG a la célula produce la coagregación de diferentes isoformas de FcγRs, lo que induce la activación de cinasas de la familia Src, éstas fosforilan a los ITAMs, los cuales permiten que se reclute y se active Syk. Syk fosforila sustratos específicos, lo que da lugar a que se propague la señal necesaria para la fagocitosis, la degranulación, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y/o la transcripción de genes como los de citocinas.

fosforilados es la cinasa de residuos de tirosina Syk, de la familia Syk-ZAP 70. La Syk una vez activada, fosforila a la fosfolipasa C (PLCγ) activándola, dando lugar a la consiguiente formación de diacilglicerol (DAG) e inositol tri-fosfato (IP₃).

El IP₃ interactúa con receptores para IP₃ presentes en la membrana del retículo endoplásmico provocando un aumento transitorio del Ca²⁺ intracitosólico. Este incremento de la concentración de Ca²⁺ libre en el citosol se cree que provoca la apertura de canales de Ca²⁺ presentes en la membrana plasmática resultando en un incremento sostenido en la concentración intracelular de este catión. El DAG formado activa la vía de la proteína cinasa C (PKC), algunos de cuyos productos pueden alcanzar el núcleo e inducir la transcripción de varios genes. Por otro lado, la cinasa Syk puede fosforilar a la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3-K), activándola y esta enzima a su vez induce la activación de proteínas con actividad dependiente de GTP (GTPasas), específicamente de la familia de Rho para reorganizar el citoesqueleto y finalmente promover la fagocitosis, la ADCC o la secreción de factores proinflamatorios (11) (Fig. 1). Componentes de la vía de señalización asociada a receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina, tales como Ras (una GTPasa pequeña), Shc fosforilada y Grb2 (ambas moléculas adaptadoras), Sos (un intercambiador de nucleótidos de guanina, activador de Ras) y MAPK (la cinasa activada por mitógenos) son también activados por la agregación de los FcγRs. Incluso se sabe que la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) la cual es responsable de la liberación de ácido araquidónico, es dependiente de la MAPK. Este proceso se inicia cuando la forma activa de la cinasa Syk fosforila a Shc y ésta

interacciona con Grb2, ésta con Sos y este complejo es capaz de activar a Ras, la cual induce la activación de Raf, una cinasa de residuos de serina y treonina. Raf a su vez activa a MEK (cinasa de MAPK o Erk) y ésta última a MAPK (también conocida como Erk1, Erk2). A través de esta vía iniciada por la activación de los FcγR activadores la señal pueda alcanzar el núcleo, activando factores de transcripción que finalmente inducirán la expresión de determinados genes (12). FcγRI y FcγRIIA inducen la activación de NF-κB (factor nuclear kappa B) en neutrófilos y FcγRIIA

induce la activación de NF-AT (factor nuclear de células T activadas).

RECEPTORES Fcγ INHIBIDORES

El receptor FcγRIIB₁ está ampliamente expresado en linfocitos B, mientras que el FcγRIIB₂ se expresa preferentemente en células del linaje mieloide. El modelo mejor estudiado de la regulación negativa de la activación celular por el FcγRIIB ocurre en el linfocito B. Tras la coagregación del receptor para antígeno del linfocito B (BCR) con el FcγRIIB sobre la misma célula, los residuos de tirosina pre-

sentes en el ITIM del FcγRIIB son fosforilados por la cinasa Lyn (de la familia Src), esto convierte a los residuos de tirosina en ligandos potenciales de proteínas con dominios SH-2. Se ha visto que péptidos sintéticos con secuencias idénticas a la de los ITIMs son capaces de unir *in vitro* a proteínas con actividad de fosfatasa. Tal es el caso de las fosfatasas de residuos de tirosina que contienen dos dominios SH-2 tipo 1 y 2 (SHP-1 y SHP-2) y la 5-fosfatasa de inosítoles (SHIP1,2) (13). Las fosfatasas una vez reclutadas al dominio citosólico del FcγRIIB, se activan y pueden

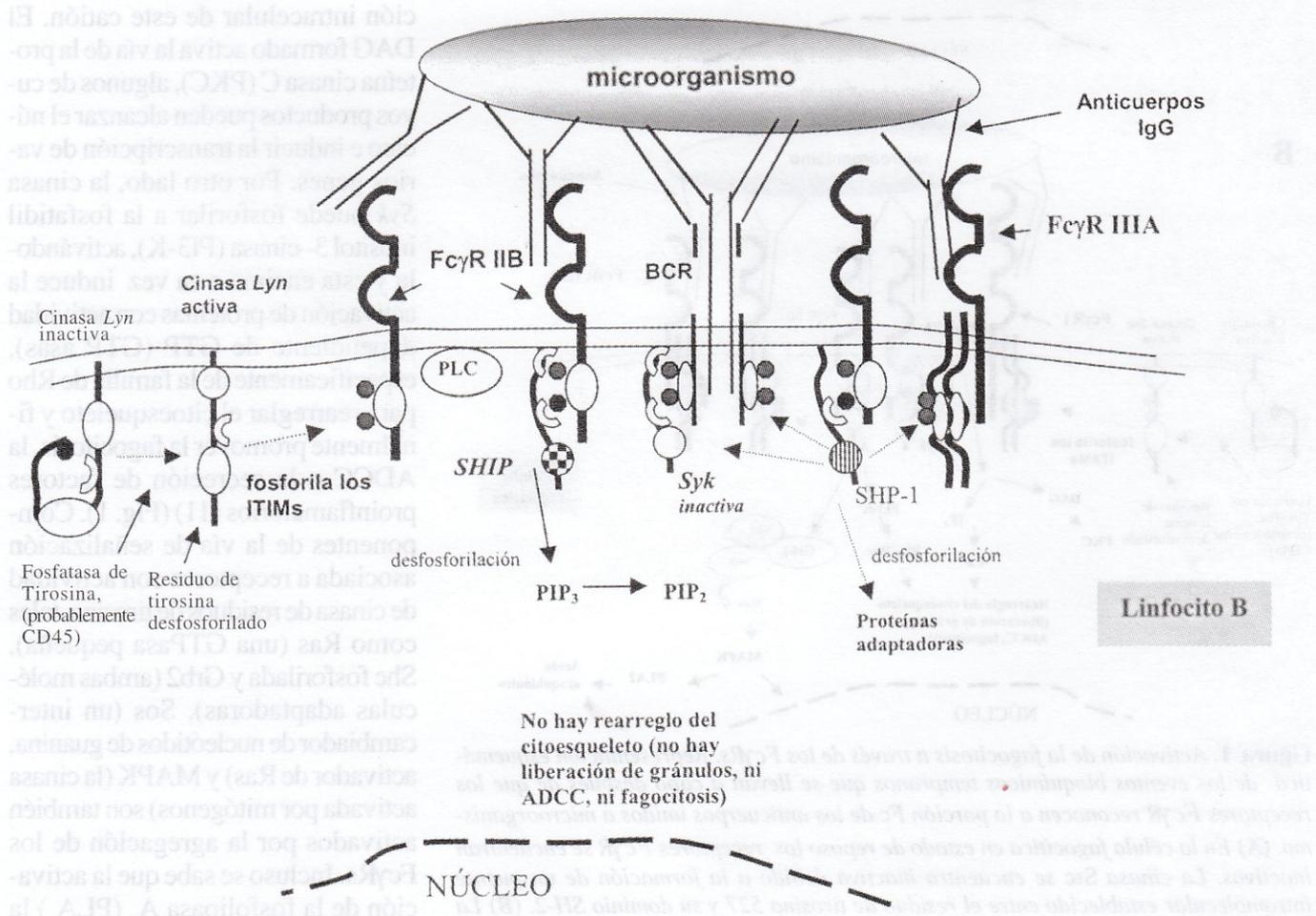


Figura 2. Regulación de la activación del linfocito B por el FcγRIIB. Representación esquemática de los eventos bioquímicos tempranos que se llevan a cabo en un linfocito B después de que los receptores FcγR reconocen la porción Fc de los anticuerpos unidos a un microorganismo por el receptor para antígeno. La coagregación del FcγRIIB recluta a las fosfatasas SHP-1 y SHIP y estas ya activadas desfosforilan a sus sustratos, impidiendo que se propague la señal de transducción. Lyn, cinasa de la familia Src; BCR, receptor de células B; PIP₂, fosfoinositol difosfato.

desfosforilar a sustratos específicos. Se ha demostrado que SHP-1 desfosforila a los residuos de tirosina de los ITAMs, a cinasas de residuos de tirosina (como a la cinasa *Syk in vitro*), y a moléculas adaptadoras (como la proteína SLP-76) (14) apagando así la señal de activación que había sido encendida por el receptor para antígeno del linfocito B, BCR (Fig. 2). El papel de SHP-2 no es aún claro en la señalización por el Fc γ RIIB. Las fosfatasa de inositol SHIP1 y SHIP2, presentan un solo dominio SH-2 en su estructura y son las encargadas de quitar un grupo fosfato de la posición 5' del fosfato de inositol (IP) y de la posición 3' del fosfatidil inositol trifosfato (PIP₃). SHIP1 tiene preferencia por el fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato, el cual es capaz de permitir la translocación a la membrana de la cinasa de Bruton (Btk) por medio de su dominio similar a la pleckstrina. En linfocitos B, Btk es importante para que la PLC γ se active e hidrolice el PIP₂ a IP₃, el cual participa en el incremento citosólico de Ca²⁺ libre (ver arriba).

Recientemente se demostró que SHIP1 recluta a una molécula adaptadora denominada Dok. En su estado fosforilado Dok recluta a RasGAP, la cual se sabe que inactiva a la vía de Ras intercambiando el GTP asociado a Ras por GDP. El papel de SHIP2 en la señalización por el Fc γ RIIB no está aún definido. Aunque ambas fosfatasas (SHP-1 y SHIP1) son capaces de unirse a los ITIM del Fc γ RIIB, esto sólo ha sido demostrado *in vitro*. Recientemente se trató de determinar si *in vivo* al momento de la coagregación del Fc γ RIIB con receptores que contienen ITAM como el BCR y el Fc ϵ RI, SHP-1 o SHIP1 se unen al ITIM del Fc γ RIIB al mismo tiempo, si una fosfatasa lo hace primero que la otra o si la unión de una u otra depende

del tipo de receptor que se este coagregando con el Fc γ RIIB en la membrana celular. No se encontró reclutamiento de SHP-1 al ITIM del Fc γ RIIB *in vivo* cuando este receptor es coagregado con el Fc ϵ RI en la membrana del mastocito, o con el BCR en linfocitos B (15).

CONCLUSIONES

Los receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (Fc γ Rs) son un grupo de moléculas estructuralmente relacionadas que se expresan en la membrana de células hematopoyéticas. Estos receptores median una amplia gama de funciones biológicas. Comprender el significado biológico de la variedad de isoformas de Fc γ Rs, y del hecho de que en la mayoría de los casos la célula expresa más de una, ha sido una tarea difícil de realizar. Asimismo todavía no conocemos con detalle las reacciones bioquímicas y las interacciones moleculares que ocurren dentro de una célula tras la agregación de los Fc γ R. Múltiples sistemas experimentales han tratado de establecer una relación entre las funciones de una isoforma particular de Fc γ R y el tipo de complejo molecular que se ensambla después de su agregación. Aunque todas las isoformas comparten a múltiples moléculas en los eventos bioquímicos iniciales de señalización, es claro que existen diferencias entre las isoformas. En el caso de la fagocitosis por ejemplo, aunque se ha demostrado que cada clase de Fc γ R humano en ausencia de otros Fc γ Rs, es capaz de mediar fagocitosis, cada isoforma tiene requerimientos particulares. Esto significa que aunque el Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC y Fc γ RIIA utilizan los ITAMs fosforilados como sitios de anclaje (interacción) para otras moléculas,

la composición de los complejos de señalización formados por cada receptor puede ser diferente. Es importante también tener en cuenta que los complejos de señalización formados por una isoforma particular de Fc γ R puede ser diferente dependiendo del tipo celular. En células NK el entrecruzamiento del Fc γ RIIA durante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos induce fosforilación en residuos de tirosina de las cinasas *Lck* (cinasa de la familia *Src*), *ZAP-70* y *Syk*. Esto indica que en células NK el Fc γ RIIA sigue una vía similar a la descrita para la fagocitosis, sin embargo se ha demostrado que ni *Lck* ni la fosfatasa CD45 son necesarias para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por el Fc γ RIIA en células NK. Por otra parte llama la atención que los Fc γ Rs no sólo inducen activación de funciones efectoras, como lo muestra el papel del Fc γ RIIB en la regulación negativa de la activación celular dependiente de los ITAMs del BCR y TCR en linfocitos B y T, y de los mastocitos-basófilos. Esto le confiere un papel inmunoregulador general a la IgG, capaz de participar en las distintas etapas de la respuesta inmune. Podemos concluir que la identidad y cantidad de las proteínas presentes en los complejos de transducción que se forman mediados por la agregación de los Fc γ Rs por complejos antígeno-anticuerpo o partículas opsonizadas no es siempre igual. Esto depende de la isoforma particular de Fc γ R, del microambiente tisular (presencia de citocinas que pueden modular la expresión de los Fc γ Rs) que rodea a la célula, y la composición de los complejos inmunes, resultando en la activación o inhibición celular.

REFERENCIAS

1. Hunkapillar T y Hood L (1989) Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol* 44:1-63.
2. Unkeless J C, Boros P y Fein M (1992) Structure, signaling, and function of Fc γ R. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Editors: Gallin JI, Goldstein IM and Snyderman R, Raven Press, pp 497-510.
3. Ravetch J V y Kinet JP (1991) Fc receptors. *Ann Rev Immunol* 9:457-492.
4. Cassel D L, Keller M A, Surrey S, Schwartz E, Schreiber A D, Rappaport E F y Mc Kenzie S E (1993) Differential expression of Fc γ RIIA, Fc γ RIIB and Fc γ RIIC in hematopoietic cells: Analysis of transcripts. *Mol Immunol* 30:451-460.
5. Daeron M (1997) Fc receptor biology. *Ann Rev Immunol* 15: 203-234.
6. Ernst L K, van de Winkel J G J, Ing-Ming Chiu y Anderson C L (1992) Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc γ RI) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem* 267:15692-15700.
7. Mates D M, Ernst L K, Chambers W H, Sulica A, Herberman R B y Morel P A (1998) Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the Fc γ RIIC gene. *Blood* 91:2369-2380.
8. Cambier J C (1995) Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 155:3281-3285.
9. Isakov N (1997) Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signal cascades. *J Leukoc Biol* 61:6-16.
10. Daeron M, S Latour, O Malbec, E Espinosa, P Pina, S Pasmans y WH Fridman (1995) The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc γ R IIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* 3:635-646.
11. Greenberg A, Chang S P y Silverstein SC (1994) Tyrosine phosphorylation of the γ subunit of Fc γ receptors, p72 *Syk*, and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 269:3897-3902.
12. Durden D L, Kim H M, Calore B y Liu Y (1995) The Fc γ RI receptor signals through the activation of hck and MAP kinase. *J Immunol* 154:4039-47.
13. Dijstelbloem H M, van de Winkel J G J y Kallenberg C G M (2001) Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *TRENDS IMMUNOL.* 22:510-516.
14. Tamir I, Dal Porto J M y Cambier J C (2000) Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. *Curr Opin Immunol* 12:307-315.
15. Binstadt B A, Billadeau D D, Jevremovic D, Williams B L, Fang N, Yi T, Koretsky G A, Abraham R T y Leibson P J (1998) SLP-76 is a direct substrate of SHP-1 recruited to killer cell inhibitory receptors. *J Biol Chem* 273:27518-27523.
16. Tamir I, Stolpa J C, Helgason C D, Nakamura K, Bruhns P, Daëron M y Cambier J C (2000) The RasGAP-binding protein p62 dok is a mediator of inhibitory Fc γ RIIB signals in B cells. *Immunity.* 12:347-358.

LOS MECANISMOS QUE CONTROLAN LA SÍNTESIS DE PROGESTERONA EN LA PLACENTA HUMANA*

Cecilia García-Pérez y Federico Martínez¹

RESUMEN

La síntesis de la progesterona en la placenta humana está sujeta a una regulación crónica. Aunque el agonista hormonal no se ha establecido, se ha sugerido un control autocrino mediado por el AMPc como segundo mensajero, el cual aumenta los niveles de ARNm de la adrenodoxina reductasa y del citocromo P450_{scc}. La progesterona se sintetiza a partir del suministro del colesterol a través de las LDL maternas. La incorporación de colesterol a la membrana externa mitocondrial es indispensable para la esteroidogénesis y depende de factores proteicos. El transporte del colesterol entre las membranas mitocondriales, así como la actividad de la adrenodoxina reductasa, son los factores limitantes de la esteroidogénesis en la placenta humana. Se sugiere que este transporte se realiza a través de los puntos de unión entre las membranas mitocondriales.

PALABRAS CLAVE: Esteroidogénesis, placenta, mitocondria, P450_{scc}, puntos de unión, colesterol.

ABSTRACT

Progesterone synthesis in human placenta is subject to chronic regulation. The hormonal stimulus that underlies chronic regulation has not been established, however, it seems to be an autocrine process. The increment in cytosolic cAMP promotes mRNA transcription of adrenodoxin reductase and cytochrome P450_{scc}, respectively. Cholesterol is supplied mainly by maternal LDL delivery. Cholesterol incorporation to the outer mitochondrial membrane is protein mediated. Cholesterol transport to the inner-membrane cytochrome P450_{scc} and adrenodoxin reductase activity are the rate-limiting steps in placental steroidogenesis. It has been proposed that this transport takes place through contact sites, generated by mitochondrial membranes attachment.

KEY WORDS: Steroidogenesis, placenta, mitochondria, P450_{scc}, contact sites, cholesterol.

INTRODUCCIÓN

La esteroidogénesis es el proceso por el cual se sintetizan hormonas esteroideas a partir del colesterol. Esto se lleva a cabo principalmente en las glándulas suprarrenales, gónadas, placenta y cerebro. Las glándulas suprarrenales producen glucocorticoides y mineralocorticoides. Los glucocorticoides regulan el metabolismo de los carbohidratos y las reacciones de estrés, provocadas por eventos

como ansiedad o agresión y que se caracterizan por la liberación de catecolaminas (adrenalina y noreadrenalina), cortisol y hormona del crecimiento. Los mineralocorticoides controlan el balance salino (mecanismo de reabsorción renal del ion Na⁺) y por lo tanto, la presión arterial. En los humanos, las células de Leydig en los testículos sintetizan los andrógenos mientras que los ovarios sintetizan los estrógenos, hormonas encargadas de mantener

los caracteres sexuales secundarios y la función reproductiva.

La esteroidogénesis en las glándulas suprarrenales y en las gónadas está sujeta a regulación crónica y aguda, mientras que el cerebro y la placenta están sujetos a regulación crónica. La estimulación crónica de la esteroidogénesis es de horas a días y se da a nivel de la transcripción de genes y la proliferación de las células esteroidogénicas. La regulación aguda es de minutos y se

*Recibido: 20 de febrero de 2002. Aceptado: 11 de junio de 2002.

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apartado Postal 70-159, C.P. 04510, México, D.F. Tel.: 5623-2168, Fax.: 5616-2419, Correo E: fedem@fmedic.unam.mx.

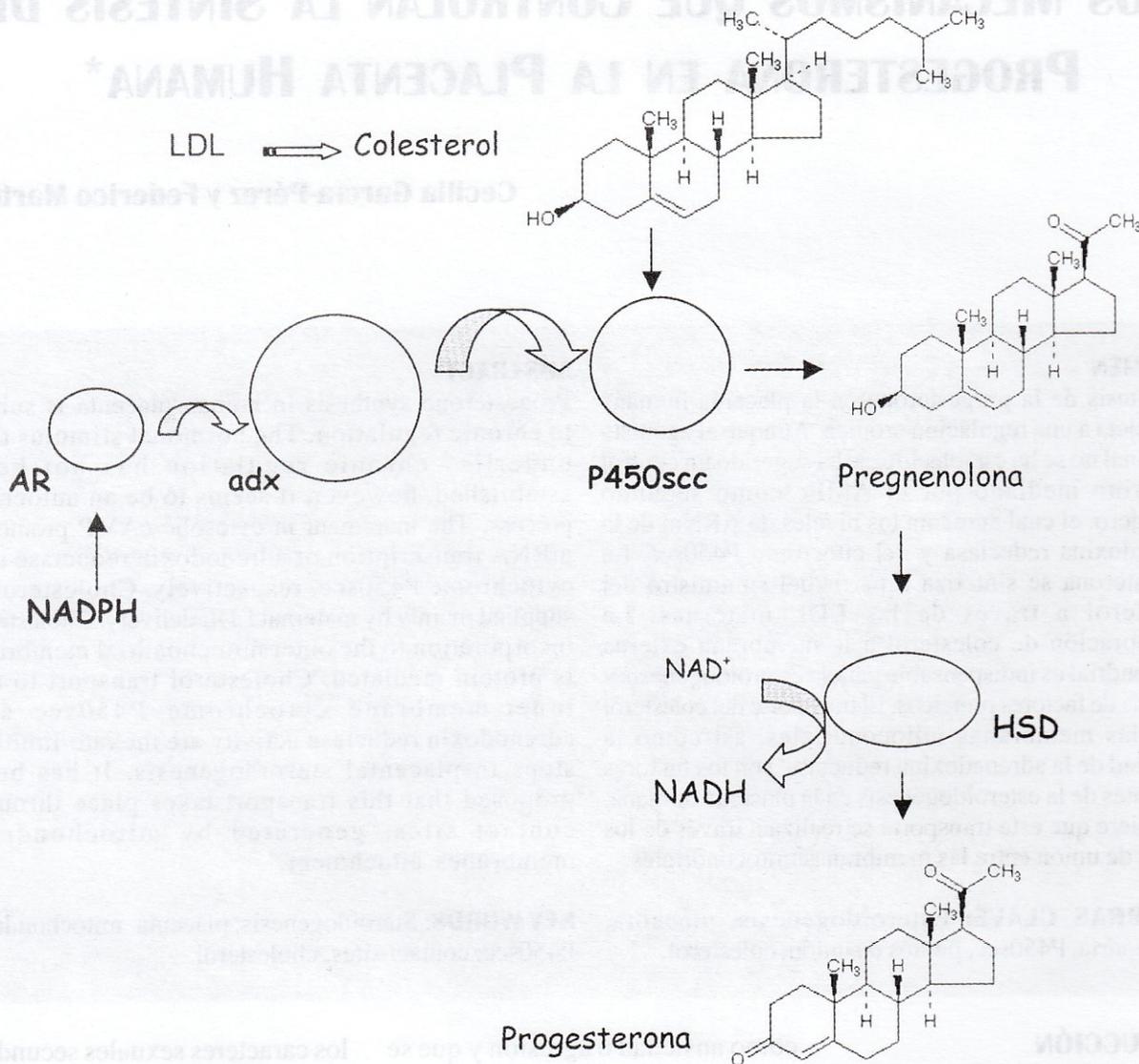


Figura 1. Vía esteroidogénica para la síntesis de progesterona en las mitocondrias. El colesterol proveniente de las LDL maternas, de las pozas citosólicas o de la síntesis de novo es el sustrato del citocromo P450scc que se localiza en la membrana interna mitocondrial. El rompimiento de la cadena lateral del colesterol requiere del transporte de electrones provenientes del NADPH, a través de la adreodoxina reductasa (AR) y la adreodoxina (adx). La 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa (HSD) transforma a la pregnenolona en progesterona.

da por la acción de las hormonas tróficas sobre la movilización y el flujo del colesterol hacia la mitocondria, donde se inicia la esteroidogénesis. Las hormonas tróficas estimulan la formación del AMPc, el cual activa a la cinasa de proteínas, PKA, que a su vez fosforila y activa a la colesterol éster hidrolasa, lo que resulta en la liberación del colesterol a partir de sus ésteres. Este coles-

terol se concentra en la membrana externa mitocondrial por un proceso poco entendido pero mediado por proteínas. El movimiento del colesterol de la membrana externa a la membrana interna mitocondrial es facilitado por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, StAR, por sus siglas en inglés. Sin embargo, como se verá, la síntesis de progesterona en la placenta, no cuenta

con los mismos mecanismos que los tejidos mencionados.

En todos los tejidos esteroidogénicos, el precursor a partir del cual se sintetizan las hormonas esteroides es el colesterol que se transforma en pregnenolona (P5). El citocromo P450scc (de sus siglas en inglés, *side chain cleavage*) se encarga del rompimiento de la cadena lateral del colesterol y da

TABLA I

AGONISTA	MODELO	MECANISMO
hCG	Célula del Trofoblasto	Utilización de LDL; aumento en la concentración del P450scc
Estrógenos	Célula del Trofoblasto	Incremento en el número de receptores de LDL
DHEA	Célula del Trofoblasto	Aumento en la actividad de la HSD
Estradiol	Homogenado de Placenta	Incremento en el ARNm de los receptores de LDL
Estradiol, P4	Célula del Trofoblasto	Incremento en el ARNm del P450scc y la HSD
Interleucina 1 β	Célula del Trofoblasto	Incremento en el AMPc
LDL	Célula del Trofoblasto	Número de receptores de LDL
HDL	Célula del Trofoblasto	Transferencia pasiva del colesterol
Benzodiazepinas	Explantos de placenta	Unión a su receptor en la membrana externa mitocondrial

Agonistas propuestos para modular la síntesis de progesterona en la placenta humana. hCG, gonadotropina coriónica humana; DHEA, dehidroepiandrosterona; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; HSD, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa. P4, progesterona.

lugar a la P5, un evento que se localiza en las mitocondrias de estos tejidos. El poder reductor para la reacción del citocromo P450scc se aporta en forma del NADPH mitocondrial a través de la enzima málica, la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (NADP-ICDH) y la transhidrogenasa (TH). El citocromo P450scc está acoplado a una cadena respiratoria que consta de una flavoproteína aceptora de electrones denominada adreodoxina reductasa (AR), una proteína transportadora de electrones con centro hierroazufre, denominada adreodoxina (adx) y el propio citocromo P450scc (Fig. 1). La estequiometría de la reacción colesterol: NADPH:O₂ es 1:3:3. De manera particular, en las mitocondrias de la placenta, la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa (HSD), dependiente de NAD⁺, transforma la P5

en progesterona (P4) (Fig. 1).

Aunque los estudios de la esteroideogénesis se han llevado a cabo principalmente en las glándulas suprarrenales y poca atención se ha prestado a la placenta, existe el consenso de que el paso limitante en la síntesis de las hormonas esteroides es el transporte del colesterol a través de las membranas mitocondriales (1, 2).

El objetivo de esta revisión es actualizar los conceptos de la regulación esteroideogénica en la placenta y compararla, en ciertos aspectos, con la actividad de las glándulas suprarrenales, haciendo énfasis en el papel que juega la membrana plasmática, algunos factores citosólicos y finalmente, el metabolismo mitocondrial.

MEMBRANA PLASMÁTICA

Durante el primer trimestre del embarazo humano el cuerpo lúteo, bajo el estímulo de la hormona lutei-

nizante, sintetiza la progesterona. Hacia el final del primer trimestre, la síntesis de progesterona se realiza principalmente en la placenta, al parecer mediada por acción de la gonadotropina coriónica (hCG) (3); sin embargo, no se ha identificado una hormona específica que regule la síntesis de la progesterona en la placenta humana; aunque se han propuesto varios candidatos, como se muestran en la Tabla I.

En los trofoblastos aislados de la placenta humana, se requiere que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) estén en el medio de incubación para observar la síntesis de progestinas. Esto indica que el aporte del colesterol es externo y un factor limitante para las células del trofoblasto. Como se verá, las células del trofoblasto no sintetizan colesterol.

Los agonistas propuestos en la esteroideogénesis de la placenta humana indican que existe una regulación autocrina, la cual puede te-

ner como mecanismo de control la internalización de los receptores de las LDL; por ejemplo, el efecto de los estrógenos parece ser sobre el número de receptores para LDL. Se ha propuesto que el mecanismo hormonal implica la transcripción de los ARNm de los componentes de la cadena del citocromo P450_{scc}, a través del efecto del AMPc como segundo mensajero.

FACTORES CITOSÓLICOS

El papel del AMPc. En general, el AMPc induce la transcripción de los ARNm de los genes blanco en regiones específicas en el ADN, denominadas CRE (de sus siglas en inglés, *c*AMP response elements). Los factores de transcripción (ATF) que se unen a las regiones CRE, son miembros de un grupo de proteínas pertenecientes a la familia del zíper de leucinas, denominados CREB (*c*AMP response element binding protein). Las proteínas CREB/ATF

contienen un sitio de fosforilación para la PKA y un dominio de unión al ADN. La regulación de las proteínas CREB/ATF se puede dar a nivel de su propia transcripción: la región promotora del gen CREB/ATF contiene CREs funcionales, es decir, sitios susceptibles a ser modulados por el AMPc.

Los tejidos esteroidogénicos presentan CREs característicos para los genes involucrados con la síntesis de hormonas esteroideas (4). En las glándulas suprarrenales y en las gónadas de humanos, la activación del AMPc sobre el gen del P450_{scc} está mediada por un CRE localizado a 1600 bases del sitio de inicio de la transcripción, mientras que el de la placenta se localiza a 100 bases. El ATF que interactúa con la secuencia CRE del gen P450 se localiza en la región promotora de éste, es una proteína tipo dedo de zinc y se denomina SF-1. El aumento del AMPc en las células del tro-

foblasto, incrementa los ARNm del citocromo P450_{scc} y de la adrenodoxina, estimulando la síntesis de P5, y al mismo tiempo regula, a nivel post-transcripcional, a la adrenodoxina reductasa de la placenta humana.

En la célula del trofoblasto, la regulación del AMPc puede darse por mecanismos paracrinos por acción de la hCG sobre la adenilato ciclasa, y a nivel físico, por la interacción entre las membranas de los citotrofoblastos al irse fusionando para formar el sinciciotrofoblasto, el cual es la unidad funcional esteroidogénicamente activa.

El papel del calcio. Durante el período de gestación, el producto es hipercalcémico en relación con la madre ($[Ca^{2+}]$ en la circulación fetal ≈ 1.4 mM vs ≈ 1.12 mM en la circulación materna), como consecuencia del transporte activo de las células del trofoblasto. Se esperaría que el movimiento masivo de Ca^{2+} a través del trofoblasto podría afectar los procesos celulares debido a los altos niveles de calcio que pasan de la madre al feto; sin embargo, esto no sucede gracias a que las células placentarias presentan sistemas de amortiguamiento, como proteínas que unen Ca^{2+} y organelos secuestradores. Esto le permite a las células del trofoblasto mantener, en el estado basal, una concentración citosólica de ≈ 50 nM de Ca^{2+} , que es similar a la de las células de hígado, corazón y cerebro de rata, indicando la eficiencia amortiguadora que tiene la célula del trofoblasto a pesar de la alta movilización de este catión. Esto tiene implicaciones bioquímicas importantes, como son la participación de la mitocondria en la homeostasis del calcio y el papel del Ca^{2+} en el metabolismo mitocondrial, ya sea en la incorporación del colesterol y/o la síntesis de las hormonas esteroideas en la placenta humana.

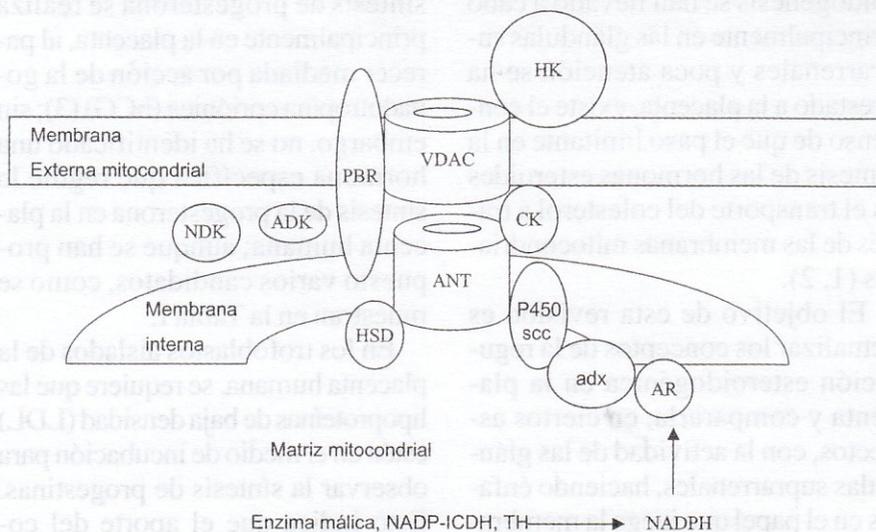


Figura 2. Modelo de Puntos de Unión. La asociación entre una porina (canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) promueve la unión entre la membrana externa y la membrana interna de la mitocondria. El aislamiento de los puntos de unión se realiza obteniendo la fracción enriquecida con la hexocinasa (HK). Se sugiere la participación de algunas cinasas del espacio intermembranal, como la adenilato cinasa (ADK), nucleótido difosfato cinasa (NDK) y la creatina cinasa (CK), así como el sistema del citocromo P450_{scc}: adrenodoxina reductasa (AR), adrenodoxina (adx) y la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa (HSD). Modificado de (2) y (15).

En las glándulas suprarrenales y en las gónadas, el segundo mensajero involucrado en la esteroidogénesis es el AMPc; sin embargo, en la zona del glomérulo de las suprarrenales de rata y en la placenta del bovino, el mecanismo para la síntesis de mineralocorticoides y progesterona, respectivamente, es mediado por Ca^{2+} , como se verá más adelante.

El movimiento del colesterol. En los tejidos de respuesta aguda, el colesterol se almacena en el citosol en forma de ésteres de colesterol. Con la estimulación de las glándulas suprarrenales por la hormona adenocorticotrófica (ACTH) o de las gónadas por la hormona luteinizante (LH) o la hormona estimulante del folículo (FSH), el colesterol esterificado se libera por la acción de la hidrolasa y se moviliza a la mitocondria. El aumento en la hidrólisis de los ésteres de colesterol va acompañado con la disminución en la esterificación y el incremento en la síntesis *de novo*, mediante la activación de la HMG-CoA reductasa. Sin embargo, en la placenta, el suministro continuo del colesterol hacia la mitocondria es aportado por las LDL maternas, ya que tanto la síntesis *de novo* como el almacenamiento del colesterol esterificado están disminuidos en comparación con los tejidos sometidos a una regulación aguda.

Aunque no está aclarada la dinámica de la distribución del colesterol entre la membrana plasmática, las pozas citosólicas y las membranas de los organelos, existen 3 posibles mecanismos: la difusión acuosa, el transporte mediado por vesículas y la participación de acarreadores solubles (5). El movimiento del colesterol hacia la mitocondria, en particular para la síntesis de hormonas esteroides,

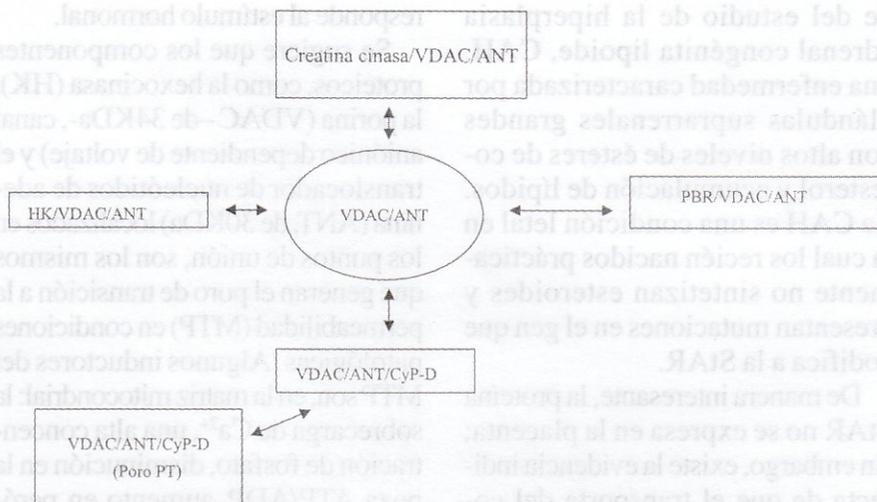


Figura 3. Complejos VDAC-ANT. La asociación entre la porina y el ANT promueve la formación de los sitios de contacto. La unión de otras proteínas depende del tipo celular y la función a realizar. Se propone que la formación de estos complejos responde a los estímulos fisiológicos y por lo tanto, son complejos altamente dinámicos. El complejo VDAC-ANT-CyP-D es señalado como megacanal o poro de transición a la permeabilidad (PT), debido a la afinidad (e inhibición) que presenta la ciclosporina A por él. PBR, receptor periférico a benzodiazepinas; el resto de las abreviaturas fueron definidas en las figuras 1 y 2. Modificado de (11).

ocurre en respuesta a hormonas tróficas vía la PKA dependiente de AMPc y parece involucrar a la proteína acarreadora de esteroides, SCP2.

El contenido del colesterol en las membranas mitocondriales del hígado de la rata varía alrededor de 3-5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, mientras que en las mitocondrias de la placenta humana está entre 15 y 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$, siendo la relación del contenido de colesterol entre membrana externa e interna de aproximadamente 3:1. Se ha propuesto que el alto contenido de colesterol en las membranas podría inducir la formación de sitios de contacto; en el caso de la placenta humana que tiene un alto contenido de colesterol, su movilización desde la membrana externa hacia la membrana interna podría ser un mecanismo de autorregulación que favorece la formación de los sitios de contacto y la estimulación de la síntesis de esteroides (6).

METABOLISMO MITOCONDRIAL

El transporte de colesterol. Como se mencionó, los mecanismos que estimulan la esteroidogénesis son variados y dependen del tejido. Por ejemplo, mientras que la síntesis de esteroides inducida por ACTH se estimula a través del AMPc, la angiotensina II o el K^+ lo hacen a través de la señalización por Ca^{2+} . Sin embargo, independientemente del estímulo, el movimiento del colesterol a través de las membranas mitocondriales en las gónadas y en las glándulas suprarrenales depende de la síntesis de proteínas, es sensible a la cicloheximida y responde a la estimulación hormonal, lo que habla de la complejidad del proceso y del estricto mecanismo que lo controla. La proteína responsable del incremento en el transporte del colesterol a través de las membranas mitocondriales hacia el P450_{scc} en estos tejidos es la proteína StAR (3,7). La evidencia directa provie-

ne del estudio de la hiperplasia adrenal congénita lipoide, CAH, una enfermedad caracterizada por glándulas suprarrenales grandes con altos niveles de ésteres de colesterol y acumulación de lípidos. La CAH es una condición letal en la cual los recién nacidos prácticamente no sintetizan esteroides y presentan mutaciones en el gen que codifica a la StAR.

De manera interesante, la proteína StAR no se expresa en la placenta; sin embargo, existe la evidencia indirecta de que el transporte del colesterol en la placenta humana es un proceso mediado por proteínas, ya que tanto la incorporación del colesterol como la síntesis de pregnenolona son sensibles al tratamiento con tripsina (8). En este sentido, se han hecho esfuerzos por encontrar una proteína similar a la StAR. Se observó en la placenta la presencia de una proteína denominada MLN64, la cual tiene gran similitud con la región carboxilo terminal de la StAR y que podría ser el factor proteico que modula la esteroidogénesis placentaria.

Los puntos de unión. Se ha propuesto que los puntos de unión o sitios de contacto entre las membranas mitocondriales son estructuras dinámicas con propósitos fisiológicos, como hacer más eficiente la regulación entre el ATP sintetizado por la fosforilación oxidativa y el trabajo celular que depende del ATP citosólico, propiciar la apoptosis o favorecer el transporte del colesterol en las células esteroidogénicas (9) (Fig. 2). La formación de los puntos de unión depende del grado de acoplamiento mitocondrial, es sensible al desacoplante dinitrofenol, es resistente al tratamiento con el detergente digitonina, se favorece en el estado 3 de la respiración (síntesis de ATP) y

responde al estímulo hormonal.

Se sugiere que los componentes proteicos, como la hexocinasa (HK), la porina (VDAC—de 34KDa—, canal aniónico dependiente de voltaje) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT, de 30KDa) localizados en los puntos de unión, son los mismos que generan el poro de transición a la permeabilidad (MTP) en condiciones patológicas. Algunos inductores del MTP son, en la matriz mitocondrial: la sobrecarga de Ca^{2+} , una alta concentración de fosfato, disminución en la poza ATP/ADP, aumento en peróxidos, alteración en el contenido del colesterol y los fosfolípidos, aumento en la relación NAD/NADH así como el estrés oxidativo (10). De hecho, un tipo de complejo VDAC-ANT-CyP-D (ciclofilina D) generador de sitios de contacto, está involucrado directamente con la apoptosis o muerte celular programada. Crompton hace una clasificación de los distintos complejos VDAC-ANT, dependiendo de la función celular a realizar (11) (Fig. 3).

En los tejidos aeróbicos que presentan una fosforilación oxidativa muy activa, el ADP producido por la HK y creatina cinasa (CK) asociados a los puntos de unión, no está disponible a la piruvato cinasa externa y, por tanto, parece ser que los puntos de unión favorecen la canalización del ADP hacia la fosforilación oxidativa (9-11). La asociación de la CK mitocondrial (MiCK) con el complejo VDAC/ANT facilita la utilización de la pareja creatina/creatina-fosfato, como forma de transporte de energía hacia el citosol.

En este contexto, se ha descrito que la unión del receptor periférico a benzodiazepinas (PBR, de 18KDa) al complejo VDAC/ANT (Fig. 2) puede regular el transporte del colesterol desde la membrana externa hacia la membrana interna mitocondrial de las células esteroidogénicas y facilitar su transformación a P5. El PBR se localiza en la membrana externa mitocondrial y se expresa en todos los tejidos, pero es más abundante en los esteroidogénicos, incluyendo a la placenta. Los agonistas para los receptores a benzodiazepinas (BR) son de los fármacos más utilizados como ansiolíticos, sedantes y anticonvulsivos, que actúan sobre los receptores de GABA en el sistema nervioso central, y al mismo tiempo estimulan la esteroidogénesis (12).

Por otro lado, se ha postulado al Ca^{2+} como segundo mensajero a través del cual el estímulo hormonal induce la formación de los puntos de unión. El incremento en la concentración libre del Ca^{2+} en las mitocondrias del hígado de la rata aumenta el número de sitios de contacto, ya que el Ca^{2+} altera la estructura de las bicapas lipídicas ricas en calmodulina. En las mitocondrias de cerebro de rata, la proteína involucrada en la regulación del Ca^{2+} en el espacio intermembranal es más abundante en los sitios de contacto (10).

En la glándula suprarrenal de rata, el incremento en el Ca^{2+} citosólico aumenta la concentración de StAR y favorece la expresión de su ARNm, así como su fosforilación, a través de los puntos de unión. De igual forma, el Ca^{2+} induce un mayor contenido del P450_{scc} y la HSD en los sitios de contacto, favoreciendo la síntesis de P5 (Fig. 2). Esto indica una mayor eficiencia de la maquinaria esteroidogénica como respuesta al efecto del Ca^{2+} citosólico y la proteína StAR para la síntesis de mineralocorticoides (13). Se ha sugerido que la estimulación en la producción de aldosterona por el Ca^{2+} mitocondrial se realiza a través de la activación de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs dependientes de NAD^+ : la piruvato deshidrogenasa, isocitrato

TABLA II

	SUPRARRENALES Y GÓNADAS	PLACENTA
Tipo de regulación	Aguda y crónica	Crónica
Agonista hormonal	ACTH; FSH, LH	hCG?, estrógenos?, P4?
Proteína implicada en el paso limitante	StAR	MNL64?
Producción de P4	Por actividad enzimática	Por cantidad de tejido
Contenido de colesterol en mitocondrias	3-5 µg/mg	15-30 µg/mg
Movilización del colesterol	LDL, ésteres de colesterol, síntesis de novo	LDL
Actividad y/o concentración del P450 _{sc}	>>100 pmol/mg	100 pmol/mg
Actividad y/o concentración de AR	>>12 pmol/mg	12 pmol/mg
Generación del NADPH para la AR	Enzima málica, transhidrogenasa	NADP-isocitrato deshidrogenasa
Tipo de HSD	Gen Tipo II	Gen tipo I
Localización de HSD	Retículo>>mitocondria	mitocondria>>retículo
Localización del sitio CRE del P450 en el genoma	A 1600 bases del sitio de inicio de la transcripción	A 100 bases del sitio de inicio de la transcripción
Consumo de oxígeno en condiciones de síntesis de ATP	70-100 ngatO/min/mg	5-30 ngatO/min/mg

Principales diferencias entre los tejidos esteroideogénicos de respuesta crónica o aguda. (>>, mucho mayor que).

deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa. El NADH generado por estas tres enzimas se transforma en NADPH por acción de la transhidrogenasa, suministrando el sustrato de la AR.

El citocromo P450_{sc}. Los citocromos P450 son monooxigenasas que metabolizan agentes externos como fármacos, carcinógenos y toxinas y también están involucrados en la biosíntesis de compuestos endógenos como la vitamina D, ami-

nas, leucotrienos y esteroides. Para su función requieren de otras proteínas transportadoras de electrones. Existen 6 tipos de citocromos P450, de los cuales tres (P450_{sc}, P450_{11 β} y P450_{aldo}) se localizan en la membrana interna mitocondrial y los otros tres (P450_{C21}, P450_{17 α} y P450_{arom}) en la membrana del retículo endoplásmico.

La actividad del P450_{sc} en las gónadas y las suprarrenales no es limitante para la esteroideogénesis, sin embargo, en las mito-

condrias de la placenta humana, el contenido de AR ([AR] \approx 12 pmol/mg) limita al 16% la velocidad máxima del citocromo P450_{sc} ([P450_{sc}] \approx 100 pmol/mg) y permite que la adx oxidada ([adx] \approx 220 pmol/mg) actúe como inhibidor competitivo de la síntesis de P5, ya que se une al mismo sitio, en el P450_{sc}, que la adx reducida (14). La reacción de la HSD en la placenta humana no es restrictiva ya que tiene una actividad de 0.7-1.7 nmol/mg/min de pro-

teína, en comparación con la actividad del P450scc, que es aproximadamente de 0.2 nmol/min/mg (la actividad del P450scc en las mitocondrias de suprarrenales de rata es de 3 nmol/min/mg). La HSD requiere de NAD⁺ como cofactor (Fig. 1). En las mitocondrias de la placenta, el contenido de NAD⁺ es de 5 nmol/mg mientras que de NADP⁺ es de 0.6 nmol/mg, sin embargo, se sabe que la concentración de NADPH para la actividad del P450scc no es limitante, ya que la Km de AR por el NADPH es $\approx 1 \mu\text{M}$. Datos no publicados de este laboratorio indican una actividad de la NADP-ICDH de ≈ 100 nmol de NADPH/min/mg. La actividad reportada para la enzima málica de la placenta varía entre 1-6 nmol de NADPH/min/mg y, aunque se ha sugerido la participación de la transhidrogenasa, la síntesis de P5 y P4 reportadas con isocitrato como sustrato, así como la alta actividad de la NADP-ICDH, sugieren que esta última es la principal proveedora del NADPH al sistema del P450scc en las mitocondrias de la placenta humana.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los tejidos que sintetizan hormonas esteroides presentan mecanismos de modulación cuyas diferencias van desde la expresión genética hasta la participación proteica. La Tabla II resume estas diferencias del metabolismo esteroidogénico entre las glándulas suprarrenales y la placenta. La regulación aguda se da por la acción de las hormonas tróficas, a través del AMPc que promueve la liberación del colesterol y su llegada a la membrana externa. El transporte del colesterol hacia el citocromo P450scc es el paso limitante, fuertemente regulado por la proteína StAR. En la placenta, el colesterol se aporta de manera constante a través de las LDL maternas y un mecanismo de control se da por la transcripción de los RNAm de los componentes de la cadena del P450scc. Las mitocondrias de glándulas suprarrenales y gónadas tienen un metabolismo esteroidogénico elevado, pero también sintetizan ATP activamente. Las evidencias experimentales señalan que la placenta lleva a cabo un metabolismo predominantemente esteroidogénico.

Los grandes y recientes avances en el estudio de la esteroidogénesis en las glándulas suprarrenales plantean cuestionamientos interesantes en el metabolismo esteroidogénico de la placenta, que son perspectivas reales y actuales como las siguientes: ¿Cómo regula la célula del trofoblasto la distribución del colesterol proveniente de las LDL? ¿Cómo se da el paso limitante a nivel del transporte del colesterol en la mitocondria de la placenta? ¿El AMPc y el Ca²⁺ en el metabolismo mitocondrial de la placenta tienen algún efecto?

Las mitocondrias de la placenta humana son un modelo interesante para estudiar estas cuestiones, y sus respuestas permitirán conocer mejor la relación entre el feto y la madre y a la vez la conservación de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo que recibieron a través del proyecto IN200399 de la DGAPA de la UNAM y de los proyectos 26096M y 37263M del CONACYT. Cecilia García es becaria del CONACYT (130011).

REFERENCIAS

- Hall P F (1985) Trophic stimulation of steroidogenesis: In search of the elusive trigger. *Recent Prog Horm Res* 41: 1-39.
- Jefcoate C R, McNamara B C, Artemenko I y Yamazaki T (1992) Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450scc in steroid hormone synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 751-767.
- Strauss III J F, Christenson L K, Devoto L y Martínez F (2000) Providing progesterone for pregnancy: control of cholesterol flux to the side-chain cleavage system. *J Reprod Fertil suppl* 55:3-12.
- Strauss III J F, Kido S, Sayegh R, Sakuragi N y Gafvels M E (1992) The cAMP signalling system and human trophoblast function. *Placenta* 13: 389-403.
- Liscum L y Underwood K W (1995) Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem* 270: 15443-15446.
- Martínez F y Strauss III J F (1997) Regulation of mitochondrial cholesterol metabolism. En: *Cholesterol: Its functions and Metabolism in Biology and Medicine*. Editor: Robert Bittman. Plenum Press, N.Y., pp 205-231.

7. Stocco D M (2000) Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta* 1486: 184-197.
8. Martínez F, Echegoyen S, Briones R y Cuéllar A (1988) Cholesterol increase in mitochondria: a new method of cholesterol incorporation. *J Lipid Res* 29: 1005-1011.
9. Brdiczka D (1991) Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein- transfer. *Biochim Biophys Acta* 1071: 291-312.
10. Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W y Brdiczka D (1996) Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain mitochondria resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* 396: 189-195.
11. Crompton M (2000) Mitochondrial inter-membrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 529: 11-21.
12. Papadopoulos V (1998) Structure and function of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenic cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 130-142.
13. Cherradi N, Rossier M F, Vallotton M B, Timberg R, Friedberg I, Orly J, Wang X J, Stocco D M y Capponi A M (1997) Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 272: 7899-7907.
14. Tuckey R C, McKinley A J y Headlam M J (2001) Oxidized adrenodoxin acts as a competitive inhibitor of cytochrome P450_{scc} in mitochondria from the human placenta. *Eur J Biochem* 268: 2338-2343.
15. Desagher S y Martinou J C (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10: 369-377.

BIOTRANSFORMACIÓN Y EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS DEL DDT*

Guadalupe Prado Flores¹, Adolfo Sierra Santoyo,²
Ma. de Lourdes López² y Arnulfo Albores²

RESUMEN

El DDT es un plaguicida organoclorado (POC) extensamente usado en la agricultura y en campañas sanitarias para la erradicación de vectores parasitarios. Actualmente su empleo está prohibido en muchos países, incluido México desde el año 2001; sin embargo, aún es posible encontrar niveles ambientales elevados del plaguicida debido a su persistencia y eventualmente afectar la salud de individuos expuestos. El DDT y otros POC son biotransformados por algunos miembros de la familia del citocromo P450 (CYP), convirtiéndolos en compuestos más hidrosolubles, los que posteriormente son conjugados con ligandos endógenos (como el ácido glucurónico) facilitando así su excreción. El DDT modifica los procesos catalizados por monooxigenasas al inducir algunas isoformas del CYP, las que intervienen en procesos metabólicos de compuestos endógenos y en la biotransformación de xenobióticos. El DDT se considera como un inductor tipo fenobarbital, pues induce las isoformas CYP2B1/2B2, aunque también induce al CYP3A2 en ratas hembra. El DDT y sus metabolitos modifican la biotransformación hepática de las hormonas esteroidales por lo que es considerado un disruptor endocrino. Por otra parte, la biotransformación del DDT en mamíferos genera algunos compuestos polares que son excretados en la orina así como otros metabolitos electrofílicos, capaces de unirse a ácidos nucleicos y proteínas para formar aductos. El objetivo de este artículo es revisar algunos aspectos bioquímicos involucrados en la biotransformación del DDT, así como su capacidad para regular diversas isoformas del CYP y su impacto sobre moléculas de relevancia fisiológica.

PALABRAS CLAVE: DDT, citocromo P450, metabolismo de xenobióticos, disrupción endocrina, testosterona.

ABSTRACT

DDT is an organochlorine pesticide (POC) extensively used in agriculture and sanitary campaigns. Its application has been banned in many countries, including Mexico since 2001, but still high concentrations in the environment can be measured. On the other hand, the introduction of a chemical function into the DDT structure or that of other POC by cytochrome P450 (CYP), a hemoprotein superfamily with overlapping substrate specificity, usually increases their polarity. Then, the resulting intermediary metabolites can be conjugated with endogenous ligands (i.e., glucuronic acid) in order to increase their water solubility and eventually and accelerate their excretion. However, DDT affects some processes catalyzed by monooxygenase by inducing some CYP isoforms. As a CYP inducer, DDT is considered as a "phenobarbital type" inducer, because it affects CYP2B1/2B2 isoforms, but CYP3A2 is also induced in female rats thus, probably acts as an endocrine disruptor. DDT and its metabolites modify the metabolism of steroids probably resulting in pathological effects. DDT biotransformation generates some electrophilic intermediates that are excreted in the urine, but in some instances, they can bind to nucleic acids and proteins. The adduction to nucleic acids may result mutagenic. Thus, the aim of this paper is to review those aspects involved in DDT biotransformation, the regulatory effects on specific CYP isoforms and the adverse effects on some physiologically relevant biomolecules.

KEY WORDS: DDT, cytochrome P450, endocrine disruption, testosterone.

*Recibido: 25 de septiembre de 2001. Aceptado: 11 de junio de 2002.

¹Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, C.P. 04960, México, D.F. México. Correo E: gprado@cueyatl.uam.mx. ²Sección de Toxicología, Cinvestav-IPN, Av. Politécnico # 2508 C.P. 07300, México, D.F. México.

INTRODUCCIÓN

México ha sido uno de los principales productores y usuarios de plaguicidas organoclorados (POC) en América Latina. Se estima que durante las décadas de los años 50's y 60's se utilizaron alrededor de 12,000 ton de POC anualmente. En el período comprendido de 1969 a 1979 el uso de estos compuestos en México promedió 9,000 ton/año, con un empleo anual de 3,900 ton de diclorodifeniltricloroetano (DDT), 2,000 ton de toxafeno, 1,600 ton de hexaclorobenceno y 300 ton de endrín. Posteriormente, en 1999 se importaron 22 ton de POC (1). Sin embargo, durante los últimos 5 años el uso del DDT descendió (Fig. 1) hasta el año 2001, cuando se prohibió su aplicación. A pesar de estas medidas de control y con base en la persistencia ambiental del plaguicida, es posible especular que el DDT usado en México aún constituye un problema de salud pública para el país.

De los POC actualmente utilizados, el DDT es uno de los más importantes. Su uso actual e histórico se refleja en la presencia de DDT y sus metabolitos en diversos productos de origen biológico, principalmente lácteos y prácticamente en todas las muestras biológicas y ambientales analizadas (2,3). A pesar de la evidencia toxicológica del DDT, éste se utilizó para campañas de salud pública y control de vectores de enfermedades como la malaria. Sin embargo, su uso continúa en otros países, pues existen registros de su producción, exportación y uso interno en países como Rusia, otros países emergentes en la ex Unión Soviética, India, China, y posiblemente también en Corea del Sur. Estudios epidemiológicos y ecotoxicológicos en animales de vida silvestre, así como investigacio-

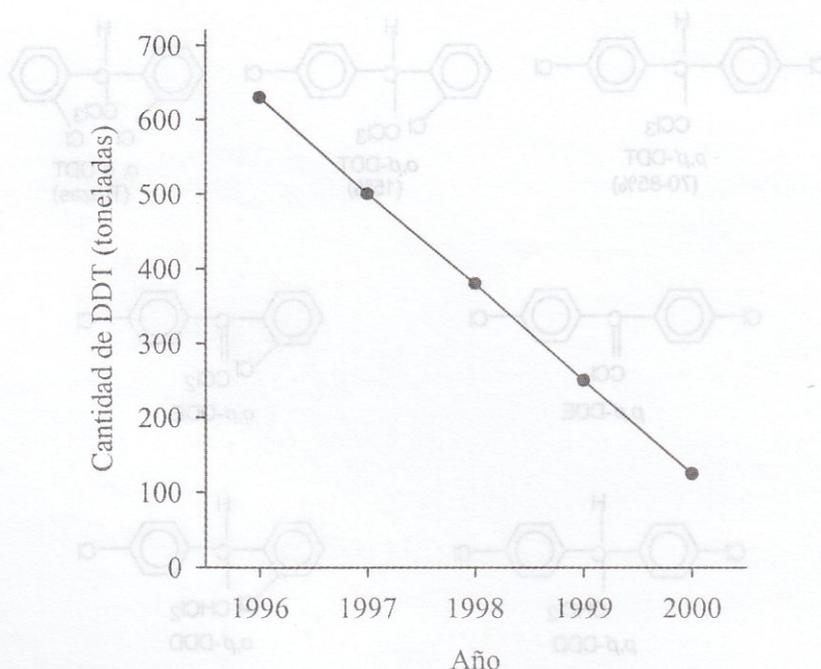


Figura 1. Consumo de DDT en el Programa de Control de la Malaria de la Secretaría de Salud en México (Referencia 1).

nes experimentales, han asociado al DDT con el desarrollo de patologías de la función reproductiva, por lo que este plaguicida es considerado como un disruptor endocrino (4). Consecuentemente, el objetivo de esta revisión es ofrecer un panorama general sobre el DDT enfatizando su papel como regulador de los citocromos P450 (CYP), la función de esta familia de hemoproteínas sobre su propia biotransformación y la de otros compuestos endógenos de relevancia fisiológica como la testosterona.

GENERALIDADES DEL DDT

El DDT es un compuesto muy lipofílico, estable y recalcitrante a la degradación. Estas características le confieren una notable persistencia en el ambiente general y particularmente en los tejidos grasos de mamíferos, incluyendo al hombre. Su vida media en el suelo es de 16 a 20 años y en sedimentos de ríos es hasta de

46 años (5). El DDT comercial es de grado técnico, es decir, es una mezcla de isómeros, siendo los principales el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano (*p,p'*-DDT) que es el isómero más abundante, el 1,1,1-tricloro-2-(*o*-clorofenil)-2-(*p*-clorofenil)etano (*o,p'*-DDT) y 1,1,1-tricloro-2,2-bis(*o*-clorofenil)etano (*o,o'*-DDT), de este último sólo se encuentran trazas, aunque también puede contener pequeñas cantidades de 1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etileno (*p,p'*-DDE), 1,1-dicloro-2-(*o*-clorofenil)-2-(*p*-clorofenil)etileno (*o,p'*-DDE), 1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano (*p,p'*-DDD) y 1,1-dicloro-2-(*o*-clorofenil)-2-(*p*-clorofenil)etano (*o,p'*-DDD) (Fig. 2). Cada uno de los isómeros del DDT y sus productos metabólicos intermedios pueden presentar un perfil toxicológico propio, lo que hace necesario conocer con profundidad la toxicocinética y toxicodinamia de estos POC.

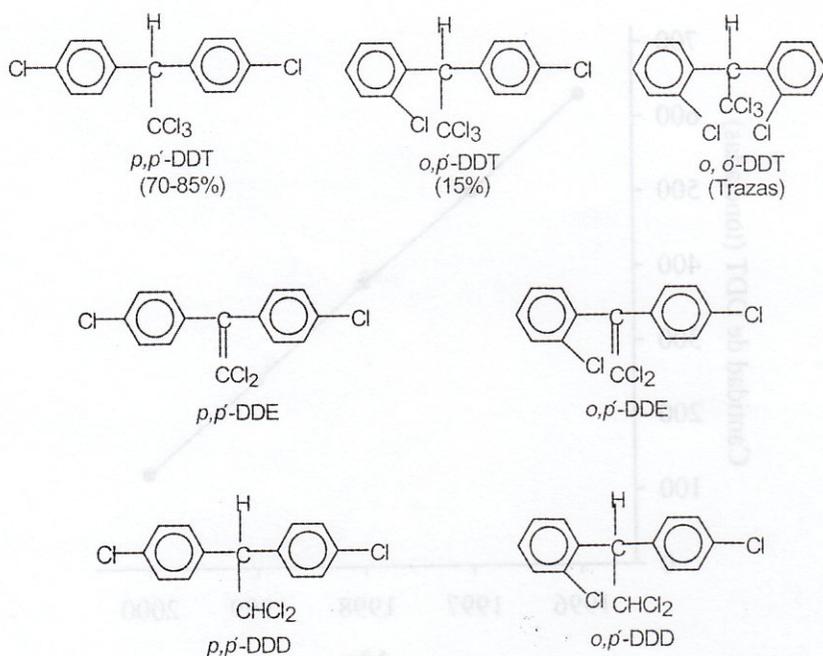


Figura 2. Estructuras químicas de los isómeros del DDT y de algunos metabolitos generados durante la biotransformación dependiente catalizada por el citocromo P450. En paréntesis se indica la proporción de los isómeros del DDT en el producto grado técnico.

TOXICOCINÉTICA DEL DDT

Absorción

La vía gastrointestinal representa la principal ruta de absorción del DDT y sus metabolitos presentes en alimentos de origen animal como leche, carne, quesos y huevos. La absorción es muy eficiente, pues en humanos y animales de laboratorio puede internarse al organismo hasta el 90% de la dosis de DDT administrada. La absorción pulmonar es una vía de menor importancia para el ingreso del plaguicida al organismo, sobre todo cuando el compuesto se encuentra en forma cristalina, pues sólo las partículas con un tamaño menor a 10 μm pueden alcanzar los alvéolos para después ser absorbidas. Finalmente, la absorción percutánea en animales de experimentación y en humanos es limitada. Estas diferencias en la eficien-

cia de absorción del DDT se refleja en su toxicidad como lo demuestran las dosis letales cincuenta (DL_{50}) correspondientes. En ratas expuestas al plaguicida por vía dérmica se han determinado DL_{50} en un intervalo de 2,500 a 3,000 mg/kg, mientras que por vía oral estos valores son marcadamente menores, de 113 a 800 mg/kg (5), lo que indica que la toxicidad por vía oral es aproximadamente de 4 a 23 veces mayor que por la vía dérmica.

Distribución y acumulación

La distribución y almacenamiento del DDT se ha estudiado ampliamente en humanos y animales de laboratorio. Una vez absorbidos, el DDT o sus metabolitos se distribuyen a todos los tejidos corporales a través de la linfa y la sangre. El almacenamiento del plaguicida en un

órgano o tejido depende de su contenido de lípidos. Por lo tanto, el tejido adiposo acumula la mayor cantidad de DDT. Este comportamiento es explicado por los elevados coeficientes de partición n-octanol/agua (>6.2) para este tipo de compuestos. Estudios en voluntarios sanos a quienes se les administraron DDT y distintos metabolitos indicaron que la acumulación ocurre de acuerdo al siguiente orden: p,p' -DDE > p,p' -DDT > o,p' -DDT > p,p' -DDD. El tiempo necesario para que el ser humano llegue a un estado de equilibrio en los depósitos del plaguicida en sus tejidos es de 12 a 21.5 meses, aunque pueden presentarse variaciones entre individuos (5).

Biotransformación

El metabolismo de DDT se ha estudiado en seres humanos y en varias especies de animales de laboratorio desde 1945. El metabolismo de fase 1 (que consiste en la introducción de un radical químico polar a un sustrato endógeno ó exógeno) y es responsable de la biotransformación del plaguicida en ratas, ratones y hamsters es similar al de humanos, sin embargo, hasta ahora no todos los metabolitos intermediarios han sido identificados en el ser humano. Por otra parte, es conocido el hecho de que el DDT induce su propio metabolismo en diversas especies, lo que indica que el plaguicida induce varias de las enzimas involucradas en su biotransformación. En la biotransformación del DDT están involucradas una gran diversidad de reacciones, tales como descloración reductiva, deshidrocloración, reducción, hidroxilación y oxidación; todas ellas en la porción alifática de la molécula. Hasta la fecha todavía no se han caracterizado todos los sistemas enzimáticos involucrados en cada una de las reac-

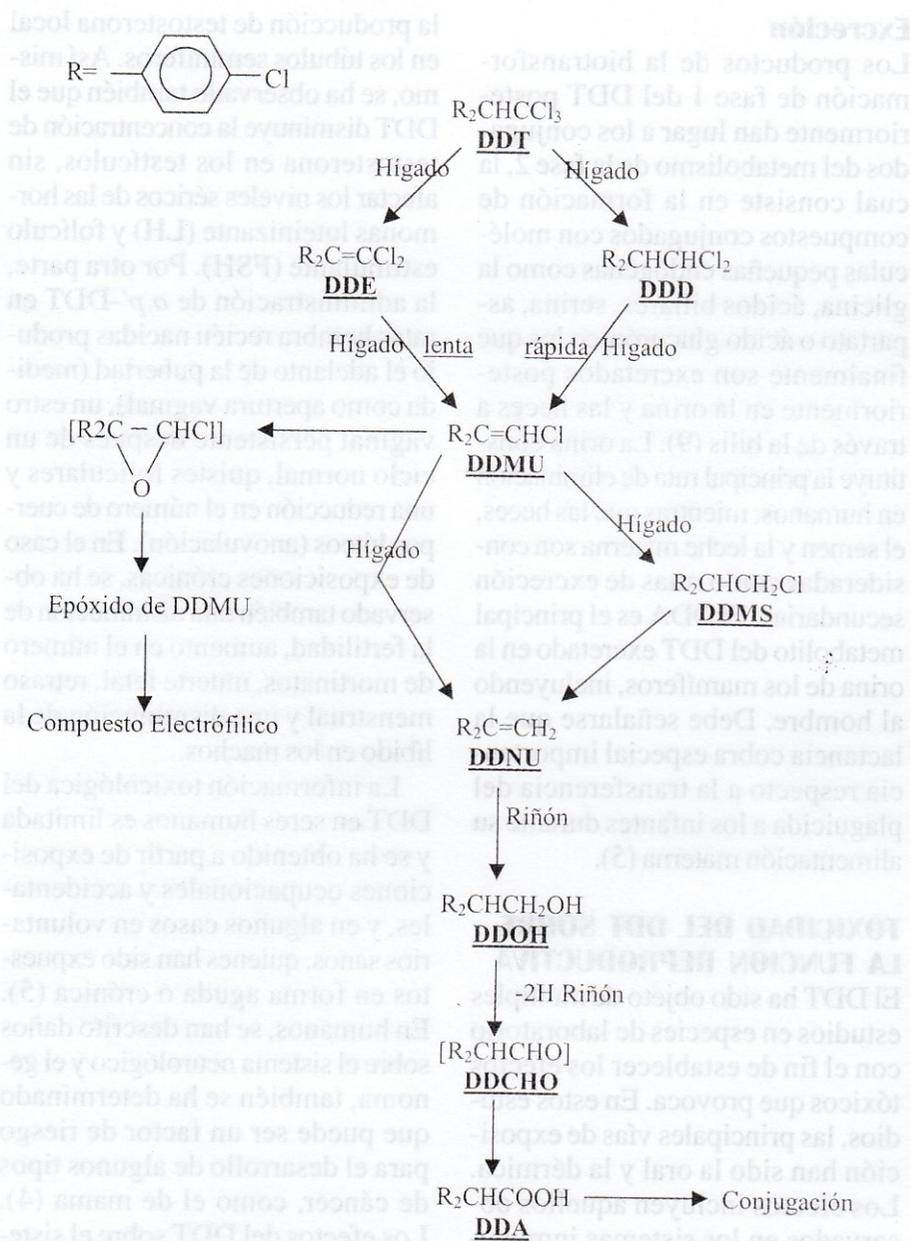


Figura 3. Biotransformación del DDT en mamíferos (adaptado de la referencia 7).

En varias de estas reacciones participan diversas isoformas de CYP. El DDT se biotransforma inicialmente en dos metabolitos intermedios, el DDE y el DDD. En la rata, el DDE se convierte lentamente en 1-cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)eteno (DDMU) en el hígado y posteriormente a ácido 2,2-bis(*p*-clorofenil)acético (DDA) en el riñón por la vía del 1,1-bis(*p*-clorofenil)etano (DDNU). El DDD es

rápidamente metabolizado por la vía del DDMU a 1-cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano (DDMS) y posteriormente a DDNU; éste a su vez es metabolizado en el riñón, a 2,2-bis(*p*-clorofenil)etanol (DDOH) y posteriormente a 2,2-bis(*p*-clorofenil)etanal (DDCHO) y a DDA (5) (Fig. 3). Hasta el momento, el mecanismo exacto de la biotransformación del DDT a DDE en humanos no ha sido totalmente aclarado

y parecen existir distintas rutas de biotransformación a diferentes edades como lo ilustra un estudio epidemiológico realizado en una población de KwaZulú (Africa) en donde se observó que en el grupo de 2 a 29 años, el metabolito predominante fue DDD seguido por el DDA lo que incrementó su eliminación, mientras que en personas mayores de 29 años predominó la formación de DDE favoreciendo su acumulación (6).

La producción de tumores hepáticos en ratones expuestos a DDT ha incrementado el interés en el estudio de los mecanismos de formación de los metabolitos intermedios reactivos. Para ello, se han utilizado microsomas de hígado, en donde ha sido posible caracterizar la descloración reductiva del *p,p'*-DDT a DDD, la cual parece ocurrir en condiciones anaeróbicas, además, la presencia de grupos tioles (-SH) parece favorecer esta reacción, aunque todavía el mecanismo de transformación es desconocido. La biotransformación anaeróbica del DDT puede dar lugar a la formación de intermediarios reactivos que se unen a lípidos microsomales. Algunos estudios realizados con microsomas de hígado de ratón muestran la formación de 2,2-bis(*p*-clorofenil)-1,2-etanediol (DDNUdiol), lo que sugiere la formación de un epóxido, el cual, al hidrolizarse y oxidarse forma el ácido 2-hidroxi-2,2-bis(*p*-clorofenil)acético, que es excretado en la orina. Se ha propuesto que el DDD es hidroxilado en el grupo etano produciéndose el cloruro de 2,2-bis(*p*-clorofenil)acetilo (Cl-DDA), el cual al perder HCl genera el DDA. Por otra parte, el Cl-DDA es un compuesto electrofílico capaz de formar acilos con moléculas nucleofílicas celulares y conducir a la formación de aductos.

Estos hallazgos sugieren que el metabolismo del DDT puede dar lugar a la formación de aductos que posiblemente sean los responsables de algunos de los efectos patológicos descritos para este plaguicida. La diferencia entre especies para desarrollar tumores inducidos por DDT se debe a la capacidad de producción de los metabolitos DDMU-epóxido o DDA-Cl (5).

Es importante señalar que estudios realizados en diferentes especies utilizando DDT marcado con isótopos radiactivos han demostrado la hidroxilación de los anillos aromáticos. Algunos de los compuestos identificados fueron el *m*-hidroxi-, el *p*-hidroxi-, el *m*-hidroxi-*p*-metoxi- y el *p*-hidroxi-*m*-metoxi-*o,p'*-DDA. También se ha propuesto la formación de derivados *p*-hidroxi-*p'*-DDE y *m,p*-epoxi-*p,p'*-DDE (7). El DDE además de formar fenoles, también puede ser transformando a *m*-metilsulfón-*p,p'*-DDE durante su biotransformación. Los metabolitos de compuestos halogenados alifáticos o aromáticos que contienen azufre usualmente se forman después de conjugarse con glutatión. Los metabolitos metilsulfonílicos del DDT, particularmente el 3-metilsulfonil-DDE, son potentes tóxicos en la corteza de las glándulas adrenales en ratones y posiblemente en humanos después de que éstos son activados por CYP. Los efectos más comunes son una extensa vacuolización celular y necrosis de la zona fasciculata. Estudios *in vitro* sugieren que estos efectos derivan de la activación del 3-metilsulfonil-DDE en la mitocondria, en donde se genera un metabolito reactivo capaz de unirse covalentemente a diversas proteínas. Debe señalarse que también se forman otros metabolitos solubles en agua (8).

Excreción

Los productos de la biotransformación de fase 1 del DDT posteriormente dan lugar a los conjugados del metabolismo de la fase 2, la cual consiste en la formación de compuestos conjugados con moléculas pequeñas endógenas como la glicina, ácidos biliares, serina, aspartato o ácido glucurónico los que finalmente son excretados posteriormente en la orina y las heces a través de la bilis (9). La orina constituye la principal ruta de eliminación en humanos, mientras que las heces, el semen y la leche materna son consideradas como rutas de excreción secundarias. El DDA es el principal metabolito del DDT excretado en la orina de los mamíferos, incluyendo al hombre. Debe señalarse que la lactancia cobra especial importancia respecto a la transferencia del plaguicida a los infantes durante su alimentación materna (5).

TOXICIDAD DEL DDT SOBRE LA FUNCION REPRODUCTIVA

El DDT ha sido objeto de múltiples estudios en especies de laboratorio con el fin de establecer los efectos tóxicos que provoca. En estos estudios, las principales vías de exposición han sido la oral y la dérmica. Los efectos incluyen aquellos observados en los sistemas inmunológico, neurológico y reproductivo, aunque también se han descrito daños genotóxicos y desarrollo de algunos tipos de cáncer. Algunos de los efectos sobre la función reproductiva debidos a la exposición por periodos cortos de DDT de ratas macho son la disminución en la fertilidad, de la espermatogénesis, del peso testicular, de la cuenta de las células de Leydig y del diámetro de los túbulos seminíferos. Estas alteraciones han sido consideradas como consecuencia de la ausencia en

la producción de testosterona local en los túbulos seminíferos. Así mismo, se ha observado también que el DDT disminuye la concentración de testosterona en los testículos, sin afectar los niveles séricos de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). Por otra parte, la administración de *o,p'*-DDT en ratas hembra recién nacidas produjo el adelanto de la pubertad (medida como apertura vaginal), un estro vaginal persistente después de un ciclo normal, quistes foliculares y una reducción en el número de cuerpos lúteos (anovulación). En el caso de exposiciones crónicas, se ha observado también una disminución de la fertilidad, aumento en el número de mortinatos, muerte fetal, retraso menstrual y una disminución de la libido en los machos.

La información toxicológica del DDT en seres humanos es limitada y se ha obtenido a partir de exposiciones ocupacionales y accidentales, y en algunos casos en voluntarios sanos, quienes han sido expuestos en forma aguda o crónica (5). En humanos, se han descrito daños sobre el sistema neurológico y el genoma, también se ha determinado que puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de algunos tipos de cáncer, como el de mama (4). Los efectos del DDT sobre el sistema reproductivo en humanos es un área que requiere investigarse más profundamente, pues éste parece ser muy susceptible al plaguicida (5). Los daños observados sobre la función reproductiva tanto en animales de laboratorio como en el humano, posiblemente derivan de las actividades estrogénica y antiandrogénica de los isómeros *o,p'*- y *p,p'*-, respectivamente, descritas para el DDT y sus metabolitos.

El hígado es un órgano blanco del DDT. En este órgano, el metabolis-

mo de xenobióticos es muy activo. En él se expresan, de manera constitutiva o inducida, una gran cantidad de isoformas de CYP. La expresión de algunas de estas isoformas depende del sexo y de la edad del individuo. Estas diferencias responden a mecanismos complejos gobernados por hormonas esteroideas, hipofisiarias, pancreáticas y tiroideas. En algunas condiciones fisiológicas, determinadas principalmente por la edad o en ciertos procesos patológicos, las actividades metabólicas cambian debido a alteraciones endocrinas asociadas.

EFFECTO DEL DDT SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO DEPENDIENTE DE CYP

Desde la década de los 60's existe interés por conocer los efectos del DDT y de sus principales metabolitos, el DDE y el DDD, sobre la inducción enzimática. Los estudios pioneros mostraron que la exposición de ratas a DDT disminuye el tiempo de sueño inducido por fenobarbital (10). Este efecto está acompañado por hepatomegalia e incrementos de la actividad de diversas enzimas microsomales hepáticas, particularmente de aquellas involucradas en el metabolismo de fase 1 y de fase 2 responsables de la biotransformación de xenobióticos (11,12). La desnutrición y la deficiencia de vitamina A disminuyen la capacidad inductora del DDT sobre el metabolismo hepático dependiente del CYP (13).

El DDT induce preferentemente algunas familias de CYPs especialmente las subfamilias 2B y 3A y en menor proporción las subfamilias 1A y 2A, y las isoformas 2C11 y 2E1. La inducción de diversas isoformas de CYP se ha hecho evidente por medio de la determinación de actividades enzimáticas específicas

o por el análisis de sus respectivas apoproteínas (14-17). La inducción de distintas isoformas de CYP en el hígado por DDT depende de la especie, el sexo y la cepa de los animales. En varios estudios en los que se han expuesto ratas macho F344/NCr a diversas dosis de DDT en el alimento durante 14 días, incrementaron de 40 a 50 veces, la *O*-desalquilación de la pentoxi-resorufina (PROD) y la *O*-desarilación de la benziloxi-resorufina (BROD), las cuales están asociadas a la subfamilia CYP2B (15). Mientras que las isoformas 1A1 y 2E1 no mostraron inducciones superiores a 3 veces respecto al grupo control después del tratamiento con DDT. Una inducción similar se observó sobre la subfamilia CYP3A cuando se determinó por medio de la actividad enzimática de la 6 β -hidroxilasa de la testosterona. Por otra parte, Li y cols. (14) observaron que las ratas hembra Sprague-Dawley inyectadas con DDT (50 mg/kg por 3 días) por vía i.p. se les incrementaron las concentraciones hepáticas de la proteína inmunoreactiva de las isoformas CYP2B1 (13 veces), CYP2B2 (18.3 veces) y CYP3A (2.2 veces), aunque ningún efecto se observó sobre el CYP2E1. Finalmente, también se demostró que el DDT y sus metabolitos inducen la expresión del mRNA del CYP2B en cultivos primarios de hepatocitos a concentraciones iguales o superiores a 1 μ M, siendo el DDE más potente que el DDT y el DDD (15).

La exposición de ratas Wistar de ambos sexos a una sola dosis de DDT tan baja como 0.1 mg/kg induce la expresión de isoformas de CYP que no se expresan normalmente en un sexo determinado. Por ejemplo, en ratas hembra, este plaguicida induce la expresión de las isoformas específicas de las ratas

macho CYP3A2, 2A2 y 2C11, aunque también se inducen algunas isoformas que se expresan de manera dominante en uno de los sexos, tales como el CYP2B1 en los machos y el CYP2A1 y 2E1 en las hembras. Esto nos indica que el DDT modula el dimorfismo metabólico hepático (16).

EFFECTO DEL DDT SOBRE EL METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA

La inducción de diversas isoformas de CYP se reflejó en un aumento de la tasa de biotransformación de la testosterona y de su perfil metabólico tanto en hembras como en machos (17). Es importante señalar que las isoformas de CYP inducidas por el DDT con excepción del CYP2E1, presentan una elevada afinidad para transformar compuestos endógenos como la testosterona y otros esteroides. Por lo tanto, la alteración de la biotransformación de testosterona dependiente de la actividad de CYPs hepáticos puede ser un mecanismo relevante para la disrupción endocrina atribuida a este plaguicida.

El DDT también induce la expresión de algunas isoformas de CYP en animales iniciados en el proceso de carcinogénesis por medio de la hepatectomía parcial y la administración i.p. de nitrosodietilamina (30 mg/kg). Por ejemplo después de la administración por 91 días del compuesto en el alimento (1000 ppm) se observa un aumento de 25 veces de las actividades enzimáticas de PROD y BROD, y ningún efecto sobre la *O*-desalquilación de la etoxi-resorufina, actividad asociada principalmente con el CYP1A1 (18). Estos resultados así como los descritos en estudios en los que se han utilizado animales no iniciados apoyan la capacidad promotora atri-

buida al DDT sobre el desarrollo de procesos carcinogénicos regulando la expresión de una gran diversidad de proteínas como en este caso, diversas isoformas de CYP. Los resultados de estos estudios contrastan con los descritos en el trabajo de Henneman y cols. (19), quienes al utilizar como modelo experimental a la rata del algodón (*Sigmodon spidus*) de ambos sexos expuestas a DDT a través del alimento (500 ppm) durante 14 días, observaron una inducción relativamente pequeña de las actividades enzimáticas de PROD y BROD (< 3 veces), independiente del género.

La información sobre el efecto que el DDT produce en el metabolismo hepático en seres humanos es limitada. En personas expuestas ocupacionalmente a DDT se ha observado un aumento de la capacidad para metabolizar el cortisol y el compuesto anti-inflamatorio usado en la clínica, la fenilbutazona lo que sugiere una inducción de la subfamilia CYP3A, la cual esta involucrada en el metabolismo de esteroides endógenos y de una gran diversidad de xenobióticos (20).

En resumen, la exposición al DDT modifica el metabolismo hepático tanto de xenobióticos como de endobió-

ticos en varias especies, entre ellos el humano, alterando así su propia biotransformación y la de otros compuestos. De esta forma puede afectar la susceptibilidad de los organismos que puedan exponerse repetidamente a compuestos que requieran bioactivación o bien aumenta su tasa de degradación eliminándolos más fácilmente y alterando la homeostasis de compuestos endógenos cuyo metabolismo depende de las monooxigenasas, la testosterona puede servir como ejemplo para ilustrar este último aspecto. La inducción de diversas isoformas de CYP hepático, algunas de ellas dependientes del sexo, sugiere que el DDT afecta la homeostasis hormonal al interferir con el funcionamiento normal de los factores moduladores de la expresión de genes de estas proteínas, como la hormona del crecimiento y la hormona tiroidea, entre otros.

CONCLUSIONES

El DDT es un POC cuyo uso está extendido mundialmente y aunque su empleo ya ha sido restringido en muchos países, este plaguicida sigue siendo un problema de salud pública debido a su persistencia ambiental y a su toxicidad. Este plaguicida es biotransformado por

el sistema hepático de monooxigenasas dependientes del CYP generando diversos productos, algunos menos polares que se acumulan fácilmente en el tejido adiposo y otros más hidrofílicos que se excretan principalmente por la orina. La leche materna constituye una ruta importante de exposición del DDT y sus metabolitos para los lactantes pues se secretan por esta vía. A nivel molecular, el DDT tiene la capacidad de modificar la expresión de diversas isoformas de CYP, principalmente aquellas involucradas en el metabolismo de esteroides e induce preferentemente al CYP2B, por lo que es considerado un inductor tipo fenobarbital. La alteración de las actividades enzimáticas dependientes de CYP puede modificar la disposición de xenobióticos y compuestos endógenos, como es el caso de las hormonas esteroidales, dando lugar a una disrupción endocrina. La relevancia fisiológica de la modulación de los CYP por compuestos exógenos y su efecto en moléculas de importancia fisiológica seguramente continuará siendo objeto de investigaciones toxicológicas más profundas.

REFERENCIAS

1. World Wildlife Fund (1999) Disease Vector Management for Public Health and Conservation. World Wildlife Fund. Washington, D.C.
2. García-Hernández R (1997) Determinación de residuos de plaguicidas organoclorados en leche pasteurizada de vaca de diversas zonas de la república mexicana. Tesis de Licenciatura en Biología, ENEP-Iztacala, UNAM. México, D.F.
3. Uribe-Ramírez T M (1997) Evaluación de los niveles de contaminación por plaguicidas organoclorados en agua y sedimento de la laguna de Mecocacán, Tabasco. Tesis de Licenciatura en Biología, ENEP-Iztacala, UNAM. México, D.F.
4. Kavlock R J, Daston G P, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray L E, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac M J, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan D M, Sinks T, Tilson H A. (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environ Health Perspect 104 (suppl. 4):715-735.

5. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2001) Toxicological Profile for DDT/DDE/DDD (Update). U.S. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA.
6. Bouwman H, Coopan R M, Becker P J y Ngxongo S. (1991) Malaria control and levels of DDT in serum of two populations in KwaZulu. *J Toxicol Environ Health* 33: 141-155.
7. Smith A G (1991). Chlorinated hydrocarbon insecticides. En: Handbook of Pesticide Toxicology. Eds. Hayes, W J. Jr y Laws, E R Jr. Academic Press, USA. pp 731-915.
8. Lund B O, Bergman A y Brandt I (1988) Metabolic activation and toxicity of a DDT-metabolite, 3-methylsulphonyl-DDE, in the adrenal zona fasciculata in mice. *Chem-Biol Interactions* 65:25-40.
9. Gingel R. (1976) Metabolism of [¹⁴C]-DDT in the mouse and hamster. *Xenobiotica* 6:15-20.
10. Conney A H (1967) Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol Rev* 19:317-366.
11. Bunyan P J, Towsend M G y Taylor A (1972) Pesticide-induced changes in hepatic microsomal enzyme systems. Some effects of 1,1-di(*p*-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane (DDT) and 1,1-di(*p*-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethylene (DDE) in the rat and Japanese quail. *Chem-Biol Interactions* 5:13-26.
12. Madhukar B V y Matsumura F (1979) Comparison of induction patterns of rat hepatic microsomal mixed-function oxidases by pesticides and related chemicals. *Pest Biochem Physiol* 11: 301-308.
13. Gupta P H, Mehta S y Mehta S K (1989) Effect of DDT on hepatic mixed function oxidase activity in normal and vitamin A-deficient rats. *Biochem Internat* 19:247-256.
14. Li H C, Dehal S S y Kupfer D (1995) Induction of the hepatic CYP2B and CYP3A enzymes by the proestrogenic pesticide methoxychlor and by DDT in the rat. Effects on methoxychlor metabolism. *J Biochem Toxicol* 10:51-61.
15. Nims R W, Lubet R A, Fox S D, Jones C R, Thomas P E, Reddy A B y Kocarek T A (1998) Comparative pharmacodynamics of CYP2B induction by DDT, DDE, and DDD in male rat liver and cultured rat hepatocytes. *J Toxicol Environ Health* 53:455-477.
16. Sierra-Santoyo A, Hernández M, Albores A y Cebrián M E (2000) Sex-dependent regulation of hepatic cytochrome P-450 by DDT. *Toxicol Sci* 54:81-87.
17. Sierra-Santoyo A, Albores A y Cebrián M E (2001) DDT increases hepatic testosterone metabolism in rats. *The Toxicologist* 60:51.
18. Flodström S, Hemming H, Wärngård L y Ahlborg U G (1990) Promotion of altered hepatic foci development in rat liver, cytochrome P450 enzyme induction and inhibition of cell-cell communication by DDT and some structurally related organohalogen pesticides. *Carcinogenesis* 11:1413-1417.
19. Henneman J R, Fox S D, Lubet R A, Ward J M y Nims R W (1994) Induction of cytochrome P-450 in *Sigmodon hispidus* (cotton rats) exposed to dietary Aroclor 1254. *J Toxicol Environ Health* 41:369-386.
20. Nhachi C F B y Loewenson R (1989) Comparison study of the sensitivities of some indices of DDT exposure in human blood and urine. *Bull Environ Contam Toxicol* 43:493-498.

* Recibido: 12 de enero de 2001. Aceptado: 9 de julio de 2002.

Laboratorio de Fisiología del Ejercicio, Facultad de Educación Física y Ciencias del Deporte, Universidad Autónoma de Chihuahua, Avenida Universidad y Paseo Orozco, Ciudad Universitaria, Chihuahua, Chih. Correo E: fherman@uach.mx, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

EJERCICIO FÍSICO AEROBIO Y LIPEMIA POSPRANDIAL*

Rosa Patricia Hernández Torres¹, Arnulfo Ramos Jiménez¹
y Marco Antonio Juárez Oropeza²

RESUMEN

La lipemia posprandial refleja el proceso post-absortivo de los lípidos ingeridos. La cantidad y el tiempo de permanencia de las lipoproteínas ricas en triacilglicerolos (LRT) en el plasma dependerá de la cantidad de grasa ingerida, de la concentración basal de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de la subfracción 2 de las lipoproteínas de alta densidad (HDL₂), de la subfracción 3 de las lipoproteínas de alta densidad (HDL₃), de la actividad de las enzimas lipoproteína lipasa (LPL) y lipasa hepática (HL). El ejercicio físico modifica el estado metabólico de los lípidos y carbohidratos, un efecto que depende de la intensidad del ejercicio y de la duración del mismo. El ejercicio aerobio estimula la actividad de la LPL y en consecuencia, modifica el metabolismo posprandial de los lípidos. Este efecto se refleja desde la primera sesión de ejercicio y es dependiente del gasto calórico y del acondicionamiento físico aerobio de los sujetos. El potencial anti-aterogénico del ejercicio ha motivado la investigación en este campo.

PALABRAS CLAVE: Ejercicio físico, lipemia posprandial, resistencia aerobia.

ABSTRACT

The postprandial lipemia reflects the postabsortive process of the ingested lipids. The clearance of the triacylglycerols-rich-lipoproteins will depend on: the quantity of fat ingested, the basal levels of VLDL, HDL₂ and HDL₃ lipoproteins, the activity of the enzymes lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL). Physical exercise modifies the metabolic state of lipids and carbohydrates. This effect will depend of the intensity and duration of the exercise. Aerobic exercise stimulates the LPL activity and consequently modifies the postprandial lipid metabolism. This effect is reflected within the first session of exercise, and depends on the energy expenditure and the endurance training state. The antiatherogenic potential of the exercise has promoted the research in this field.

KEY WORDS: Physical exercise, postprandial lipemia, endurance exercise.

INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico es un conjunto de signos y síntomas que se presenta en patologías de etiología multifactorial, estrechamente relacionadas por la afección metabólica denominada resistencia a la insulina. La aterosclerosis, las enfermedades vasculares isquémicas (cerebral, periférica y del miocardio), la diabetes mellitus tipo II,

la hipertensión arterial, la obesidad central, las dislipidemias, la hiperinsulinemia, entre otras enfermedades, comparten esta incapacidad celular de responder a la acción de la insulina (Ins).

Las concentraciones de los lípidos en plasma se evalúan tradicionalmente en ayuno, como uno de los parámetros indicadores de riesgo cardiovascular y del síndrome

metabólico. Sin embargo, en 1979 Zilversmit sugirió que, debido a la alta concentración y al tiempo prolongado que las lipoproteínas ricas en triacilglicerolos (LRT) y sus remanentes circulan por la sangre durante el período posprandial, cualquier alteración en su depuración, podría promover el desarrollo de la aterosclerosis. En apoyo a esta hipótesis, Jeppesen en 1995 (1) de-

* Recibido: 12 de enero de 2001. Aceptado: 9 de julio de 2002.

¹Laboratorio de Fisiología del Ejercicio, Facultad de Educación Física y Ciencias del Deporte, Universidad Autónoma de Chihuahua. Avenida Universidad y Pascual Orozco, Ciudad Universitaria, Chihuahua, Chih. Correo E: rhernant@uach.mx,

²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

mostró que hay una fuerte relación entre la resistencia a la insulina y el metabolismo posprandial de los lípidos. Lo anterior ha promovido el estudio de la lipemia posprandial, no solo como fenómeno fisiológico, sino además como factor potencialmente pro-aterogénico.

El ejercicio es un factor que aumenta la sensibilidad a la insulina para que las células musculares capten más glucosa, por mecanismos dependientes e independientes de la insulina. El ejercicio promueve en la célula una mayor movilización de las vesículas que contienen los transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT 4) a la superficie celular y en consecuencia, su mayor absorción. A menor concentración plasmática de glucosa se estimula menos al páncreas para la síntesis y secreción de insulina. De esta manera, en sujetos con entrenamiento físico, ante una prueba de fijación euglicémica la glucosa captada es mayor

o, en una prueba de tolerancia a la glucosa, el cociente de las áreas bajo la curva de la insulina y de la glucosa (Ins/Glu) es menor (Tabla I) (2).

El ejercicio físico aerobio, realizado sistemáticamente, incrementa la capacidad del metabolismo oxidativo de los lípidos. La menor concentración plasmática de insulina, promovida por el ejercicio, permite una mayor duración de la activación de la lipasa sensible a hormonas (LSH) del tejido adiposo y muscular, lo que favorece la hidrólisis de los triacilglicerolos (TAG) en estos tejidos. Por otra parte, el ejercicio físico estimula la síntesis de LPL del tejido muscular e inhibe la actividad de la LPL del tejido adiposo, a fin de promover la captación de ácidos grasos (AG) por el tejido muscular. Adicionalmente, el ejercicio físico aerobio aumenta en el músculo esquelético el número de mitocondrias y las enzimas de la β -oxidación.

El incremento en el metabolismo oxidativo de los lípidos, inducido por el ejercicio, se refleja en una menor concentración plasmática de TAG y de lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como en una mayor concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL), en contraste con las observadas en un estado previo sin ejercicio (Tabla I) (2). En concordancia con estas respuestas y adaptaciones, estudios por calorimetría indirecta acerca de los principales sustratos que oxidan individuos con acondicionamiento físico aerobio, en estado de reposo, se observó que tienen un menor cociente de recambio respiratorio (RER) con relación a los individuos no entrenados; esto significa una mayor utilización de lípidos como fuente energética (Tabla II).

Por la capacidad del ejercicio físico para disminuir el tiempo de depuración sanguínea de los lípidos de la dieta, así como para incrementar

TABLA I

INFLUENCIA DE DOS PROGRAMAS DE ACONDICIONAMIENTO FÍSICO AEROBIO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y CARBOHIDRATOS EN SUJETOS SEDENTARIOS

PROGRAMA ^a	PARÁMETRO	ANTES	DESPUÉS
1	TAG (mg/dL)	104.5 ± 19.9	72.0 ± 15.5**
2		148.4 ± 46.7	111.0 ± 31
1	LDL-C (mg/dL)	103.0 ± 4.6	85.2 ± 6.5*
2		122.6 ± 18.6	107.0 ± 5.7*
1	HDL-C (mg/dL)	32.9 ± 2.6	37.3 ± 3.0
2		43.0 ± 5.5	49.2 ± 6.5*
1	Ins/Glu	0.84 ± 0.09	0.45 ± 0.09**
2		0.49	0.27

^aPrograma de acondicionamiento físico: 1= ciclismo, 60% del VO_2 max por 2 h, durante 22 días consecutivos, en hombres jóvenes; 2= ciclismo, 55% del VO_2 max por 2 h, 6 días/semana, durante 100 días, en hombres obesos.

TAG = Triacilglicerolos; LDL-C = colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad; HDL-C = colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad; Ins/Glu = área bajo la curva de la insulina entre el área bajo la curva de la glucosa, en una prueba de tolerancia a la glucosa.

*p < 0.05. **p < 0.01

TABLA II

PARÁMETROS DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS EN VARONES ADULTOS ENTRENADOS AERÓBICAMENTE[§] Y EN SUJETOS NO ENTRENADOS

Parámetro	Entrenados	No entrenados
Vida media de Qm-TAG ^{&}	3.0 ± 0.8 min.	4.0 ± 1.0 min*
Lipemia posprandial (TAG _{AUC})	2.5 ± 1.2 mM/ 8h	6.1 ± 1.9 mM/ 8h*
RER: 50% VO ₂ max	0.78 ± 0.01	0.80 ± 0.01**
RER: 70% VO ₂ max	0.81 ± 0.01	0.83 ± 0.01**

[§]Atletas de nivel competitivo.

[&]Evaluado por la desaparición de los TAG en los Qm de mayor tamaño (Sf > 1000).

TAG_{AUC} = Triacilgliceroles-área bajo la curva.

RER = tasa de recambio respiratorio (VCO₂/VO₂), evaluada 3 h después de realizar el ejercicio a la intensidad indicada (% VO₂ max). *p < 0.05, **p < 0.01.

su metabolismo oxidativo, se le considera un factor anti-aterogénico (Tabla II). Para su correcta inclusión en los programas preventivos y curativos, requiere que se defina para cada tipo de ejercicio: el tiempo por realizarse sistemáticamente, las intensidades del ejercicio y los gastos calóricos necesarios.

EJERCICIO FÍSICO Y SUMINISTRO ENERGÉTICO

Durante la realización de un ejercicio físico se activa el metabolismo oxidativo de los lípidos y de los carbohidratos, pues durante su ejecución se utilizan básicamente los AG y la glucosa como sustratos energéticos. Las fuentes de AG para el ejercicio físico de baja a mediana intensidad son principalmente los TAG intracelulares del músculo, los del tejido adiposo intermuscular y los ácidos grasos del plasma provenientes de TAG del tejido adiposo. Sin embargo, cuando el ejercicio es prolongado, como en maratones o pruebas a campo traviesa y cuando el ejercicio se realiza posterior a una ingesta reciente de grasa, hay resultados que sugieren la utilización de TAG de las VLDL o de los qui-

lomicrones (Qm).

Dependiendo de la intensidad y la duración del ejercicio, la demanda energética es abastecida por la oxidación completa de AG y glucosa o por la oxidación parcial de glucosa a piruvato. La contribución de uno u otro sustrato energético depende de la intensidad del ejercicio, del tiempo que se sostenga, así como del nivel de acondicionamiento aerobio del sujeto. El acondicionamiento aerobio de un sujeto se valora por la medición de su consumo máximo de oxígeno (VO₂ max), el cual es una medida de la cantidad máxima de oxígeno que un ser vivo es capaz de usar para producir energía y se maneja en términos absolutos en litros por minuto (L/min) o relativos (ml/kg/min). Por lo anterior, el VO₂ se emplea como un parámetro para medir la intensidad del ejercicio. A mayor acondicionamiento aerobio, mayor VO₂ max y mayor la intensidad y la duración del ejercicio aerobio submáximo que se puede sostener. De esta manera, en términos absolutos, a un VO₂ de 2 L/min, los sujetos acondicionados aeróbicamente consumen un 58% más de AG del plasma y un 92%

menos de glucosa que los no acondicionados (3). En términos relativos, un atleta con un VO₂ max de 64 ml/kg/min y que durante 30 min realiza un ejercicio físico a un intensidad correspondiente al 64% de su VO₂ max, oxida 68% más de lípidos y 24% menos de carbohidratos que un sujeto no acondicionado aeróbicamente cuyo VO₂ max es de 45 ml/kg/min, y que realiza el mismo ejercicio, a la misma intensidad relativa (64% de su VO₂ max).

LIPEMIA POSPRANDIAL

Las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles (LRT) están constituidas por los Qm, los remanentes de Qm (remQm), las VLDL₁ (fracción de VLDL de mayor tamaño y directamente proveniente del hígado) y sus derivados de hidrólisis: VLDL₂ y lipoproteína de densidad intermedia (IDL). Durante el período posprandial las LRT incrementan su concentración entre 2 a 3 veces y retornan a sus niveles basales en un tiempo de 6 a 12 h, siguiendo, cada una de ellas, cinéticas diferentes (Fig. 1).

Los Qm formados en las células epiteliales intestinales, después de

una ingesta alimentaria, son secretados conteniendo las apolipoproteínas (apo) A-I, A-II, A-IV y B-48. Después de pasar el torrente linfático y llegar a la circulación general, los Qm adquieren de las HDL las apo C-I, C-II, C-III y E, en magnitud preferente a la que reciben las VLDL y empiezan a ser hidrolizados por la acción de la LPL en las células endoteliales de los capilares sanguíneos de los tejidos adiposo, muscular y cardiaco (Fig. 2). Producto de este proceso de hidrólisis se forman los remanentes de quilomicrones, aún con más cantidad de apo C-II en su partícula que el resto de las LRT y en consecuencia con mayor susceptibilidad a la acción de la LPL (4,5).

Posterior a la ingesta calórica, los Qm alcanzan su concentración máxima en el plasma (TAG_{pico}) entre las 1-4 horas. Las VLDL₁ presentan una meseta en su elevación, desde la primera hasta la tercer hora. Las VLDL₂ y las IDL no contribuyen en magnitud importante en el incremento de las LRT durante el período posprandial, pues sus concentraciones son similares a las de ayuno (Fig. 1) (4).

En la circulación, las LRT además de estar sometidas a la hidrólisis continua de sus TAG, realizan con las HDL el intercambio de un TAG por un éster de colesterol (E-Col), por medio de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), en el proceso denominado transporte reverso del colesterol (TRC). En este proceso, el remQm y las VLDL₂ con un exceso de fosfolípidos (PL) en su partícula debido a la remoción de los TAG, cede los PL a las HDL₃ nacientes o a las HDL₂ aún ricas en PL o con bajo colesterol, por medio de la acción de la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP). Las HDL₃ y HDL₂ reciben también colesterol (Col) proveniente de los tejidos o de

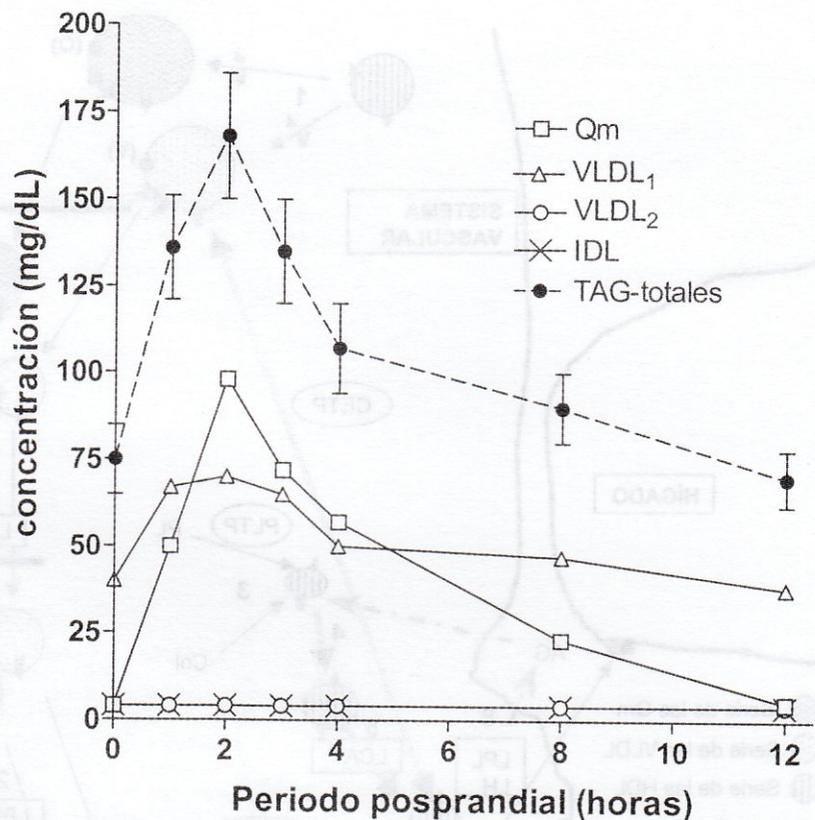


FIGURA 1. Lipemia posprandial en individuos sanos. Se representan los cambios en la concentración plasmática de triacilgliceroles (TAG) totales y de las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles (Quilomicrones, VLDL₁, VLDL₂, e IDL) en función del tiempo transcurrido después de la ingesta de una comida con alto contenido de grasa. No se muestran los cambios en los valores de colesterol (esterificado y no esterificado) y fosfolípidos, ya que la variación de su concentración es mínima (aprox. 10%) debido a su bajo contenido en la dieta de prueba.

las LRT, y por la acción de la enzima lecitina:colesterol *O*-acil transferasa (LCAT) se transesterifica el colesterol con un ácido graso del PL. La CETP intercambia el éster de colesterol por un TAG con una molécula de LDL o con una LRT. Durante el período posprandial, la mayor cantidad de E-Col intercambiado (75% o más) se realiza con las LDL y en segundo lugar con las VLDL₁ (aproximadamente 15%) (Fig. 2). Durante este período y concordante con la afinidad y magnitud de recepción del E-Col, la apo C-I, cuya acción es estimular a la LCAT, se incrementa significativamente en las moléculas de VLDL₁ y VLDL₂ (5).

Finalmente, los remQm y las LDL son captados por el hepatocito en un proceso mediado por el receptor para apo-B/apo-E; este proceso es favorecido principalmente por la HL y en menor grado por la LPL del hepatocito (Fig. 2).

Por otra parte, en el espacio intersticial de los hepatocitos y por acción de la HL y de la LPL, los TAG y los PL son removidos de las HDL₂ y retoman la forma de HDL₃. De esta manera, las HDL₃ vuelven al torrente circulatorio y continúan captando más Col de los tejidos o de las LRT, PL de las LRT, así como intercambiando E-Col por TAG con las LDL y VLDL₁ (Fig. 2).

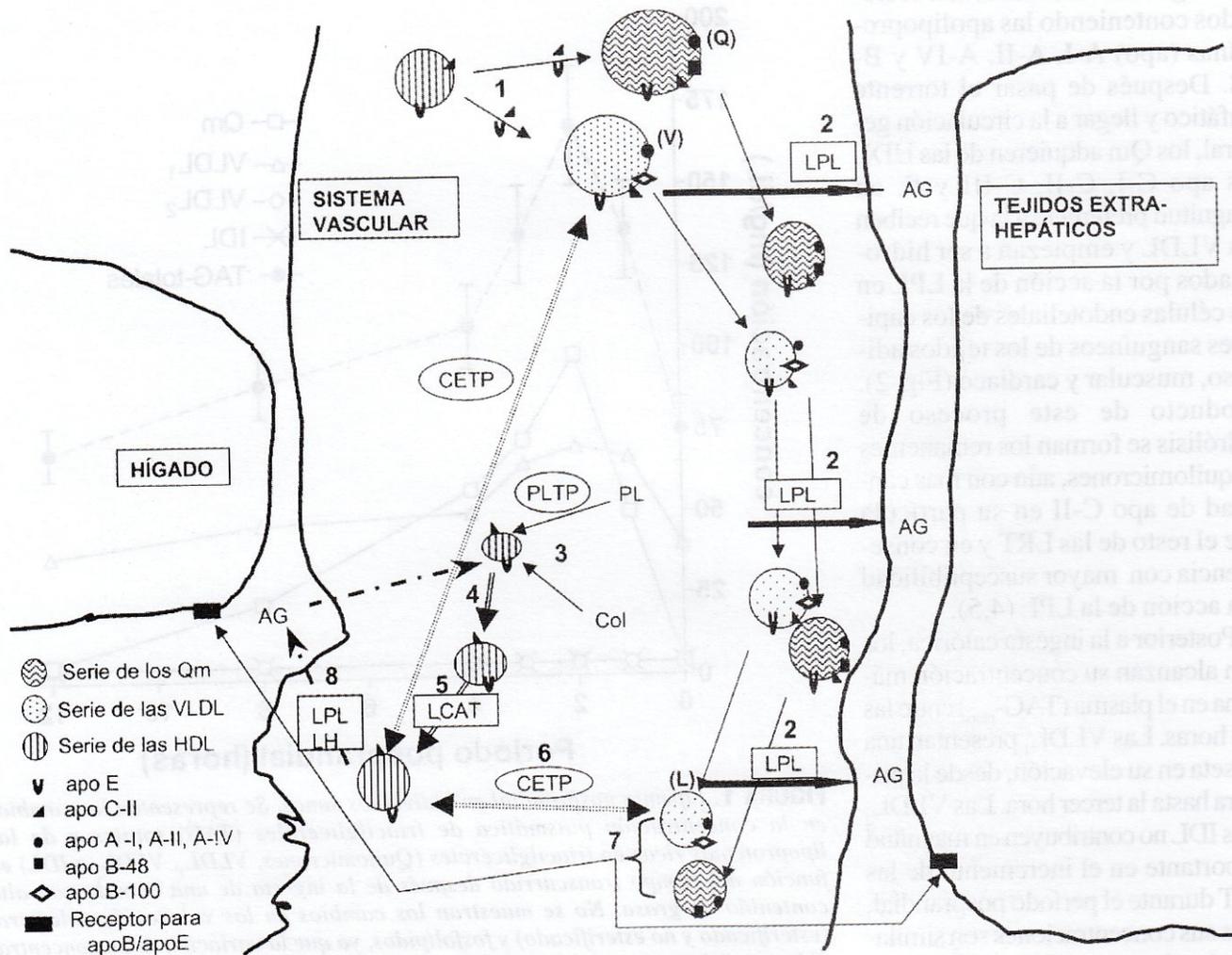


FIGURA 2. Metabolismo posprandial de las lipoproteínas ricas en triacilglicerol (LRT) utilizando una descripción simplificada y progresiva. 1.- Los quilomicrones (Q), conteniendo las apo B-48 y A, así como las VLDL₁ (V) conteniendo las apo B-100 y A, reciben de las HDL las apo C-II y E. 2.- En el endotelio de los capilares, los Qm y las VLDL₁ son degradados progresivamente por la lipoproteína lipasa (LPL), en ácidos grasos (AG) y glicerol. Producto de este proceso degradativo resultan los remanentes de Qm (remQm), las VLDL₂ y las IDL. 3.- En la sangre, las HDL₃ captan colesterol de las células y del conjunto de LRT. Los fosfolípidos también son captados de las LRT por la acción de la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP). 4.- Posterior a estos cambios, las HDL₃ se denominan HDL₂ ricas en colesterol. 5.- El colesterol en la superficie de la HDL₂ es esterificado con un ácido graso liberado de la transesterificación de la lecitina, por la actividad de la lecitina:colesterol O-aciltransferasa (LCAT). 6.- La CETP transfiere ésteres de colesterol de las HDL₂ a las LDL (L) y a las VLDL₁ (V), así como TAG de estas lipoproteínas a las HDL₂. 7.- Las LDL y los remQm, libres del exceso de Col y PL, pero enriquecidos con E-Col, son endocitados por el hígado o tejidos extrahepáticos vía receptor para apoB/apoE. 8.- Las HDL₂ por actividad de la lipasa hepática (HL) y de la LPL, son reconvertidas en HDL₃.

Para evaluar la lipemia posprandial se requiere la ingestión, en ayuno, de una comida alta en grasa, y durante un período de 6 a 12 horas post-ingesta se determina la concentración de los TAG plasmáticos cada hora. A partir de sus valores se grafica la cinética de

aparición y depuración de las LRT. En la evaluación de esta prueba se considera la concentración máxima plasmática de TAG (TAG_{pico}) y la sumatoria integral (área bajo la curva) de los TAG en el tiempo (TAG_{AUC}). A menor concentración de TAG_{pico} y me-

nor TAG_{AUC}, se considera un mejor metabolismo posprandial de lípidos.

Son varias las alteraciones metabólicas que pueden ocasionar que la depuración de las LRT se modifique. Por esta razón, en algunos estudios, esta prueba posprandial es

TABLA III

EFECTO DEL MOMENTO DEL EJERCICIO, CON RELACIÓN A LA INGESTA ALIMENTARIA RICA EN GRASA^c, SOBRE LA LIPEMIA POSPRANDIAL (TAG_{-AUC})

Momento del ejercicio según la ingesta alimentaria	Volumen e intensidad del ejercicio	TAG _{-AUC} % de cambio ^{&}
1.5 h después ⁽⁶⁾	1.5 h al 40% VO ₂ max,	-24
1.5 h después ⁽⁷⁾	1.5 h al 40% VO ₂ max	-34
15.0 h antes ⁽⁸⁾	2.0 h al 30% VO ₂ max	-31
1 h después ⁽⁹⁾	1.0 h al 60% VO ₂ max	-5
1 h antes ⁽⁹⁾	1.0 h al 60% VO ₂ max	-38
12 h antes ⁽⁹⁾	1.0 h al 60% VO ₂ max	-51

VO₂ max: consumo máximo de oxígeno; TAG_{-AUC}: triacilglicerol-área bajo la curva

[&] con relación a los valores obtenidos en la sesión sin ejercicio.

^c El contenido de grasa se especifica en el cuerpo del manuscrito.

enriquecida con la cuantificación de otros indicadores del metabolismo de lípidos y carbohidratos, los cuales según su concentración pueden influir en la depuración de los TAG o indicar alteración en su metabolismo. Entre los parámetros más empleados está la relación insulina/glucosa, los AG, las HDL y sus subfracciones (HDL₂ y HDL₃), las apolipoproteínas y la LPL.

LIPEMIA POSPRANDIAL Y EJERCICIO FÍSICO

El ejercicio, si se compara con el reposo, promueve una mayor y más rápida depuración de los TAG plasmáticos cuando se realiza tanto antes como después de una ingesta alimenticia (Tabla III). Entre los primeros informes se encuentra un estudio donde un grupo de sujetos, después de haber ingerido una co-

mida de 620 kcal con un 80% en grasa y de haber reposado 2 h, caminó 16 km (Fig. 3A). Este grupo se comparó contra otro grupo que ingirió la misma dieta, pero que reposó en cama. En el grupo de los caminantes, los valores de TAG_{-pico} posprandiales fueron 28% menores que los observados con el grupo que reposó. Estudios posteriores controlan la distancia y la

TABLA IV

INFLUENCIA DE LA DURACIÓN E INTENSIDAD DEL EJERCICIO REALIZADO 12-15 h ANTES DE LA INGESTA ALIMENTARIA RICA EN GRASA^c, SOBRE LOS VALORES DE TAG_{-AUC}

Duración e intensidad del ejercicio	TAG _{-AUC} % de cambio ^{&}
1.5 h al 30% del VO ₂ max (10)	-15.0
1.5 h al 60 % del VO ₂ max (10)	-25.5
3.0 h al 30 % del VO ₂ max (11)	-32.5
1.5 h al 60 % del VO ₂ max (11)	-31.6
1.5 h al 60 % del VO ₂ max (12)	-18.1
3x (0.5 h) al 60 % del VO ₂ max (12)	-17.7

VO₂ max: consumo máximo de oxígeno; TAG_{-AUC}: triacilglicerol-área bajo la curva.

[&] con relación a los valores obtenidos en la sesión sin ejercicio.

^c El contenido de grasa se especifica en el cuerpo del manuscrito.

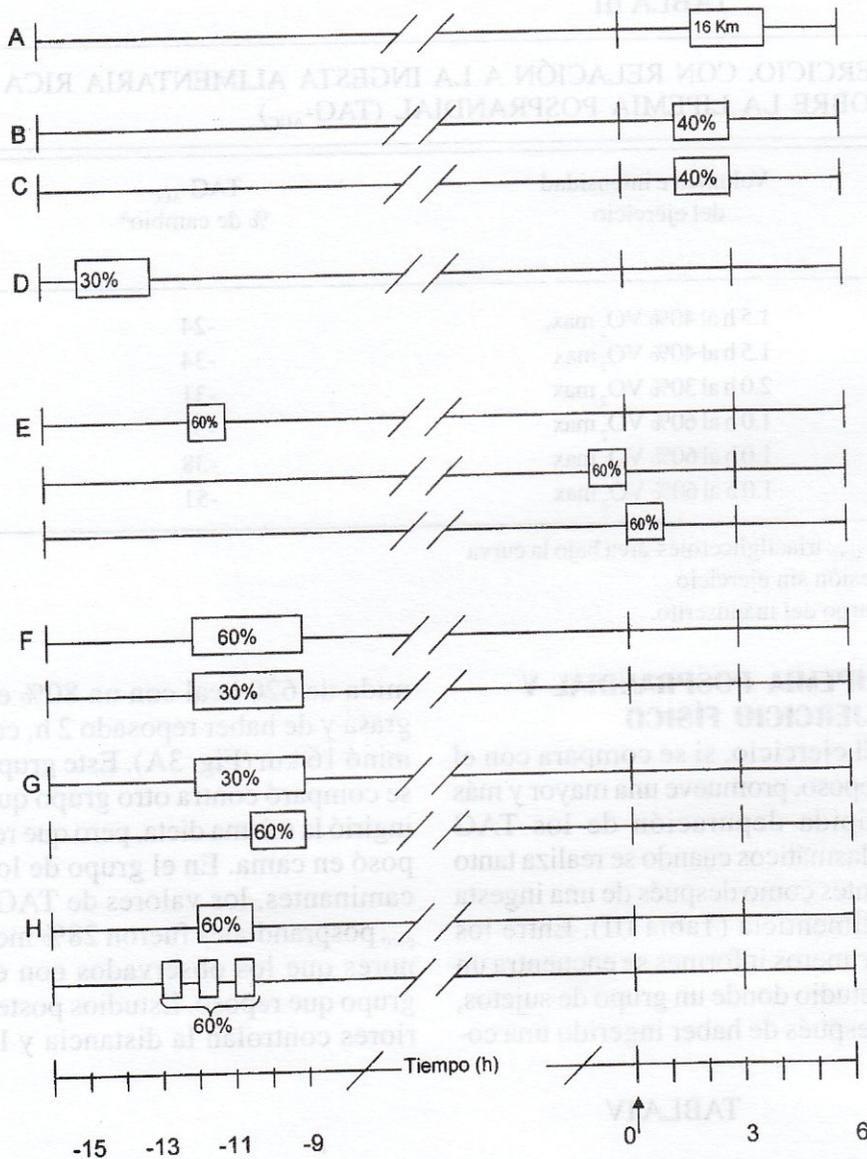


FIGURA 3. Diagramas para el análisis del efecto del ejercicio sobre la lipemia posprandial. **A.-** Caminata después de una ingesta calórica. **B.-** Caminata en banda sin fin 1.5 h después de una ingesta calórica. **C.-** Sesión en ciclo ergómetro 1.5 h después de una ingesta calórica. **D.-** Caminata 12 h antes de una ingesta calórica. **E.-** Comparación del momento de la realización del ejercicio: 12 h antes, inmediatamente antes y 1 h después de una ingesta calórica. **F y G.-** Comparación de la combinación de la intensidad y la duración del ejercicio. **H.-** Comparación entre un ejercicio continuo y otro fraccionado en 3 sesiones durante el día.

intensidad del ejercicio. En uno de ellos, se controló el ejercicio con un ciclo ergómetro y en otro con una banda sin fin; en ambos se observó una disminución de los TAG_{AUC} en un 24% y 34%, respectivamente. Estas sesiones de ejercicio fueron

realizadas al 40% de su VO₂ max, hora y media después de la ingesta de 1180 kcal con 62.5% de grasa y el período posprandial analizado fue de 6 h (Fig. 3B, 3C y Tabla III) (6, 7). Entre los trabajos que evalúan el efecto del ejercicio antes de

la ingesta de alimento rico en grasa, se encuentra uno de caminata que causó una disminución del 31% de los TAG_{AUC}. La caminata fue al 30% del VO₂ max y realizado 1.5 h previas a la ingesta de 1180 kcal con 62.5% de grasa (Fig. 3D y Tabla III) (8). Otro estudio comparó tres momentos diferentes de realizar el ejercicio: una y doce horas antes y una hora después de ingerir 980 kcal, con un contenido de grasa de 91.8%. El ejercicio realizado 12 h previas a la ingesta del alimento (-12 h) provocó una disminución de los TAG_{AUC} del 51%, mientras que el realizado 1 h previa (-1 h) indujo una disminución del 38%, en contraste con el realizado 1 h posterior, en donde se observó una disminución de tan solo el 5% (Fig. 3E y Tabla III) (9). El ejercicio que provocó un mayor efecto sobre la lipemia posprandial fue el efectuado entre 12 y 15 h previas a la prueba. La variación en los porcentajes de decremento de los TAG_{AUC} que indujeron los diferentes esquemas de ejercicio, muy probablemente sea debida a la diferente cantidad de calorías y porcentajes de grasas consumidas, así como al tipo e intensidad del ejercicio aplicado.

Para estudiar el efecto del ejercicio sobre la lipemia posprandial, el modelo más conveniente es el ejercicio previo a la ingesta calórica, ya que tiene la ventaja de no ser afectada por la demanda visceral de flujo sanguíneo, establecida durante el período posprandial.

Con el modelo de realizar el ejercicio entre 12 a 15 h previas a la prueba de lipemia posprandial, se ha evaluado el efecto de diferentes gastos calóricos, a través de controlar el tiempo y la intensidad del ejercicio (Fig. 3F-3H y Tabla

IV). El caminar 1.5 h al 60% del VO_2 max, produjo un 70% más de disminución en los TAG_{AUC} que el caminar el mismo tiempo a la mitad de la intensidad (Fig. 3F) (10). Por otra parte, el caminar 3 h al 30% del VO_2 max causó efectos similares en el TAG_{AUC}, que el caminar la mitad de tiempo al doble de la intensidad (Fig. 3G) (11). Realizar el ejercicio en forma continua o fraccionada mostró resultados semejantes cuando se mantuvo constante el gasto energético: un ejercicio por 1.5 h, al 60% del VO_2 max, o fraccionado en 3 sesiones de 30 min a la misma intensidad, provocaron un efecto similar en los TAG_{AUC} (Fig. 3H) (12).

Con relación a otros parámetros, el realizar ejercicio físico previo a una prueba de lipemia posprandial, en comparación con la sesión de reposo, induce una disminución entre 8-31% del valor TAG_{pico} (7, 8, 11), entre 16-27% los TAG de ayuno (8, 11, 13) y aumenta entre 24-30% los AG en ayuno (12, 13). El área bajo la curva de la concentración plasmática de la insulina disminuye entre 22 y 31%, sin modificarse el área bajo la curva de la concentración plasmática de la glucosa (11, 12). El ejercicio fraccionado en 3 sesiones de 30 min por día, induce una disminución significativa de la concentración basal de insulina (22%), no así un ejercicio continuo de 90 min (11). Con relación a las HDL y las HDL₂ la respuesta es inconsistente, pues en algunos estudios se ha observado incremento en su concentración (8, 9), pero en otros no se detectan cambios (7, 11-13).

El efecto de una sesión de ejercicio aeróbico, previo a la prueba de lipemia posprandial, también es observable en sujetos sedentarios,

aunque la magnitud de esta disminución es menor que la detectada en personas con acondicionamiento físico. Un ejercicio de 90 min al 60% del VO_2 max, 15 h antes de la prueba posprandial, indujo una disminución de 16% en los TAG_{AUC} de mujeres sedentarias, en contraste con el 30% observado en las mujeres acondicionadas (13). Por otra parte, el efecto del entrenamiento sobre la depuración de los TAG plasmáticos se pierde rápidamente ya que sujetos entrenados que dejan de hacer ejercicio por dos días presentan valores similares de los TAG_{AUC} a los observados en personas sedentarias; no obstante, las concentraciones posprandiales de insulina y de AG se conserva inferiores en los sujetos acondicionados (14).

La mejor respuesta de los sujetos entrenados, a una prueba de lipemia posprandial, es atribuible a que los sujetos con acondicionamiento físico tienen mayor masa muscular, mayor actividad de LPL y menor de HL, que los individuos sedentarios (15). Los TAG en ayuno en los sujetos acondicionados correlaciona directamente con los valores de TAG_{AUC} ($r = 0.41-0.87$) (9,10). Los valores de TAG_{pico} y los de TAG_{AUC}, correlacionan inversamente con la actividad de la LPL ($r = -0.52$). Cuando el ejercicio se realiza posterior a la ingesta alta en grasa, la disminución en la lipemia posprandial es atribuible a la capacidad del ejercicio de liberar la LPL adherida a los proteoglicanos del espacio extracelular de las células endoteliales ("efecto heparínico") y de esta forma promover la mayor y más rápida hidrólisis de los TAG. Por otra parte, cuando el ejercicio se realiza entre 12 y 15 h

previas a la prueba posprandial, la disminución de los TAG basales, TAG_{AUC}, y TAG_{pico} es atribuible a una estimulación transcripcional de la LPL. Estudios en humanos han mostrado que el ejercicio aerobio incrementa el ARNm de la LPL muscular, con una expresión máxima del ARNm a las 4 h post-ejercicio y de la LPL activa a las 8 h post-ejercicio (16).

Con las presentes evidencias y desde el punto de vista del papel de los lípidos sanguíneos en el proceso aterogénico, el ejercicio aerobio de baja y moderada intensidad (30-60% del VO_2 max), confiere un efecto anti-aterogénico, ya que es capaz de inducir menores concentraciones de TAG en el ayuno, una menor concentración de TAG_{pico} en la curva posprandial y una menor cantidad de TAG_{AUC}. Estos cambios en los parámetros de la prueba de lipemia posprandial se logran con una sola sesión de ejercicio, dependen del gasto energético total consumido por el ejercicio, y en sujetos con acondicionamiento aerobio la magnitud de la respuesta es mayor. No obstante, estos cambios se pierden en un tiempo tan corto como de 2 días. Como mecanismos de acción más importantes que induce el ejercicio para modificar la respuesta a una prueba de lipemia posprandial, se postula un incremento en la sensibilidad a la insulina y una estimulación de la síntesis y actividad de la LPL.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo recibido por la beca de CONACyT (RPHT, ARJ), beca de PROMEP (RPHT), y por el donativo PAPIIT-UNAM (IN218999, MAJO). También agradecen a la Arq. Ana María Hernández por la realización de las figuras.

REFERENCIAS

1. Jeppesen J, Hollenbeck C B, Zhou M-Y, Coulston A M, Jones C, Ida Y-D y Reaven G M (1995) Relation between insulin resistance, hiperinsulinemia, postheparin plasma lipase activity, and postprandial lipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:320-324.
2. Després J-P y Lamarche B (1994) Low intensity endurance exercise training, plasma lipoproteins and the risk of coronary heart disease. *J Int Med* 236:7-22.
3. Sidossis L, Wolfe R R, Coggan R (1998) Regulation of fatty acid oxidation in trained vs untrained men during exercise. *Am J Physiol* 274(Endocrinol Metab 37):E510-E515.
4. Lassel T S, Guérin M, Auboiron S, Chapman J y Guy-Grand B (1998) Preferential cholesteryl ester acceptors among triglyceride-rich lipoproteins during alimentary lipemia in normolipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:65-74.
5. Björkegren J, Karpe F, Milne R y Hamsten A (1998) Differences in apolipoprotein and lipid composition between human chylomicron remnants and very low density lipoproteins isolated from fasting and postprandial plasma. *J Lipid Res* 39:1412-1420.
6. Hardman A E y Aldred H E (1995) Walking during the postprandial period decreases alimentary lipaemia. *J Cardiovasc Risk* 2:71-78.
7. Schlierf G, Dinsenhacher A, Kather H, Kohlmeier M y Haberbosch W (1987) Mitigation of alimentary lipemia by postprandial exercise -phenomena and mechanism. *Metabolism* 36:726-730.
8. Aldred H E, Perry I C y Hardman A E (1994) The effect of a single bout of brisk walking on postprandial lipemia in normolipidemic young adults. *Metabolism* 43:836-841.
9. Zhang J Q, Thomas T R y Ball S D (1998) Effect of exercise timing on postprandial lipemia and HDL cholesterol subfractions. *J Appl Physiol* 85:1516-1522.
10. Tsetsonis N V y Hardman A E (1996) Effects of low and moderate intensity treadmill walking on postprandial lipemia in healthy young adults. *Eur J Appl Physiol* 73:419-426.
11. Tsetsonis N V y Hardman A E (1996) Reduction in postprandial lipemia after walking: influence of exercise intensity. *Med Sci Sports Exerc* 28:1235-1242.
12. Gill J M, Murphy M H y Hardman A E (1998) Postprandial lipemia: effects of intermittent versus continuous exercise. *Med Sci Sports Exerc* 30:1515-1520.
13. Tsetsonis N V, Hardman A E y Mastana S S (1997) Acute effects of exercise on postprandial lipemia: a comparative study in trained and untrained middle-aged women. *Amer J Clin Nutr* 65:525-533.
14. Herd S L, Lawrence J E M, Malkova D, Murphy M H, Mastana A, Hardman A E (2000) Postprandial lipemia in young men and women of contrasting training status. *J Appl Physiol* 89:2049 - 2056.
15. Cohen J C, Stray-Gundersen J y Grundy S M (1991) Dissociation between postprandial lipemia and high density lipoprotein cholesterol concentrations in endurance-trained men *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 11:838-843.
16. Seip R L, Mair K, Cole T G y Semenkovich C F (1997) Induction of human skeletal lipoprotein lipase gene expression by short-term exercise is transient. *Am J Physiol* 272(Endocrinol Metab 35):E255- E261.

El Yin y el Yan de la Homeostasis Sanguínea*

Pedro A. Prats¹; Massiel del Rosario²

RESUMEN

El sistema circulatorio mantiene un control estricto de su homeostasis, lo que significa la existencia de un fino balance entre los procesos que regulan la formación de coágulos, que contribuyen a evitar pérdidas de sangre ante daños a los vasos, y los que gobiernan la disolución de los trombos una vez que se ha abortado el peligro de sangramiento excesivo. Cuando el equilibrio se desplaza en cualquiera de los sentidos, acontecen eventos que pueden poner en riesgo la vida del individuo, como la obstrucción trombótica de un vaso importante que limite o impida el suministro de oxígeno y nutrientes al órgano comprometido o en el otro extremo la existencia de sangramientos que puedan conducir al shock y la muerte. En la primera vertiente participan moléculas como los factores de la coagulación, la trombina, y la fibrina y las plaquetas como efectores finales. El escenario se completa con la contraparte representada por los anticoagulantes heparina, prostaciclina, la antitrombina III y el eje trombomodulina-proteína C activada con su cofactor proteína S. Por otra parte el sistema fibrinolítico puede romper entramados de fibrina de los coágulos fisiológicos por acción de los activadores del plasminógeno que generan la plasmina. Esta posibilidad fisiológica se ha explotado para el tratamiento de trastornos trombóticos mediante la administración de dosis suprafisiológicas de activadores del plasminógeno que hasta hoy constituyen la mejor opción terapéutica.

PALABRAS CLAVE: trombolítico, coagulación, fibrina, plasmina.

ABSTRACT

The circulatory system maintains a tight homeostatic control, which means that the processes regulating clot formation exist in a fine balance with those ruling clot lysis. When this equilibrium is broken somehow potentially life threatening events may occur, for instance thrombotic occlusion of a key blood vessel, limiting or stopping blood and nutrient supply to the compromised organ or the opposite effect of bleeding to shock or death. On the first side there are a number of molecules involved such as coagulation factors, thrombin as well as fibrin and platelets as final effectors. Featuring on the other side of the stage are heparin, prostacyclin, antithrombin III and the axis thrombomodulin-activated protein C with protein S as cofactor. The fibrinolytic system breaks fibrin networks through plasminogen activators generating plasmin. This physiologic potential has been exploited to treat thrombotic disorders by administration of supraphysiological doses of plasminogen activators that constitute the best therapeutic choice so far.

KEY WORDS: thrombolytic, blood clotting, fibrin, and plasmin.

INTRODUCCIÓN

En el tratamiento de trastornos trombóticos entre los que se incluyen el infarto miocárdico agudo (IMA), la enfermedad vascular periférica oclusiva, el tromboembolismo pulmonar y la trombosis cere-

bral, el empleo de agentes trombolíticos de distinta naturaleza se ha hecho cada vez más importante (1-3). La disolución de los trombos supone una compleja interacción entre los trombolíticos y los diversos componentes de los sistemas de coagu-

lación y fibrinolítico. El presente trabajo intenta realizar un recuento de la fisiología de los sistemas que garantizan la homeostasis y de los eventos que condicionan la formación de los trombos y su disolución. Del mismo modo se delinearán el pa-

*Recibido: 27 de junio de 2001. Aceptado: 11 de junio de 2002.

¹Grupo de Toxicología y Farmacología y ²Grupo de Comercialización Heberbiotec. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apdo. 6162. CP 10600. La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 218070. Correo E: ppp10600@yahoo.com

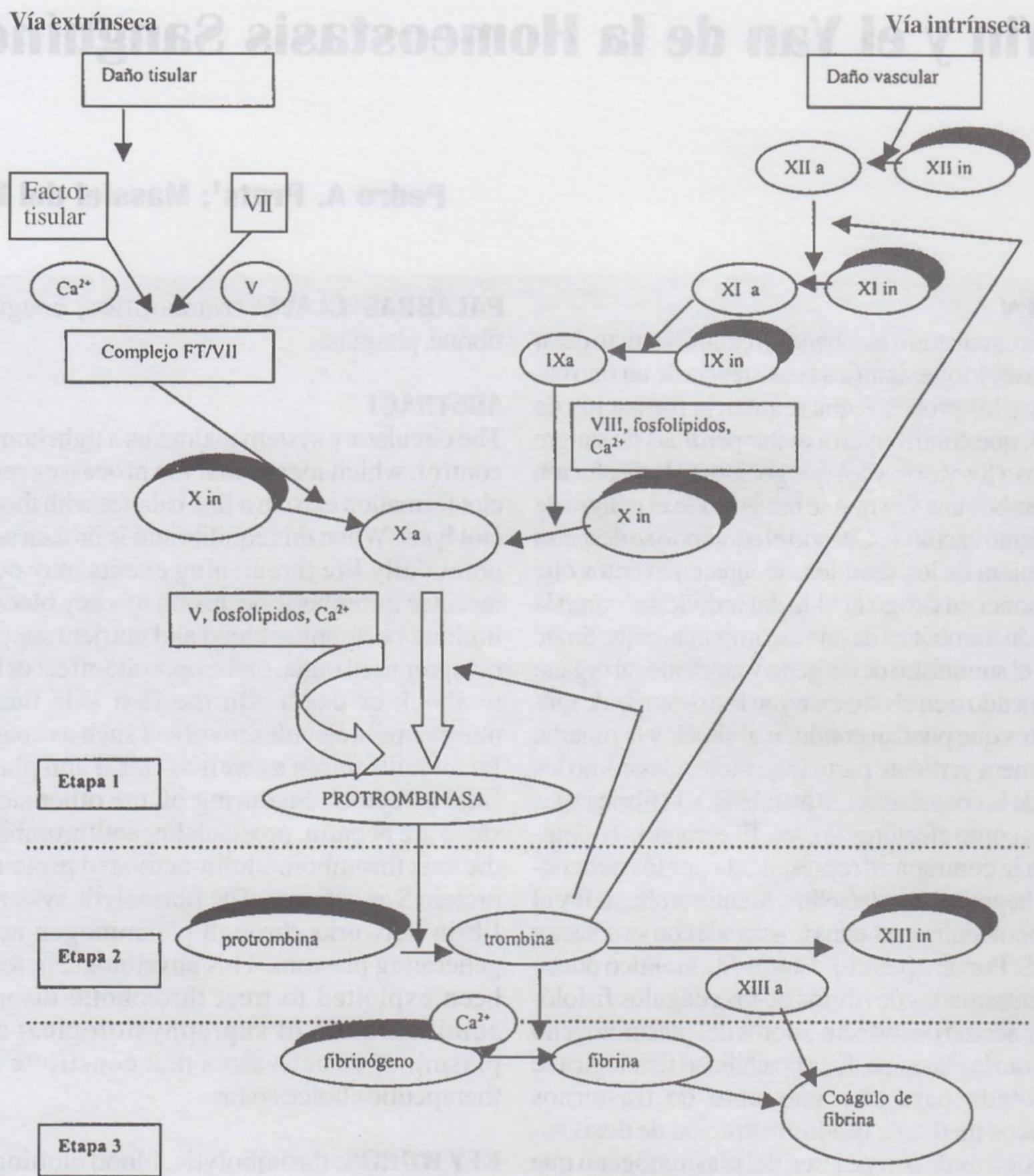


Figura 1. Representación de las vías extrínseca e intrínseca de la coagulación. Tras la ocurrencia de lesiones a los tejidos o vasos sanguíneos, se produce la activación secuencial de los factores de la coagulación por cortes proteolíticos de los precursores inactivos. La primera etapa concluye con la formación de la protrombinasa, que cataliza la activación de la protrombina a trombina (etapa 2), la que transforma al fibrinógeno en fibrina insoluble (etapa 3) que forma la trama que agrupará las fibras, las plaquetas que forman en trombo. La propia trombina modula su formación y la estabilización del trombo. Nótese que los componentes precursores inactivos (in) aparecen sombreados como simbolización de su mayor complejidad estructural, mientras que los productos activados (a) no lo están.

pel que en este conjunto tienen los diferentes activadores del plasminógeno empleados como trombolíticos.

SISTEMA DE COAGULACIÓN

La formación de coágulos es importante en el mantenimiento de la homeostasis. El sangramiento excesivo

puede conducir a un estado consistente en la disminución progresiva del volumen sanguíneo y la presión arterial, con trastornos de la homeostasis y muerte eventual. Por fortuna cuando ocurre daño vascular, se sucede una serie de eventos que evitan la pérdida excesiva de sangre. La hemosta-

sis o detención del sangramiento puede dividirse en tres etapas:

- Espasmo vascular

Se trata del cierre inmediato, pero temporal de un vaso sanguíneo por la contracción de la musculatura lisa de la pared del vaso. Se produce por re-

TABLA I

FACTORES PLASMÁTICOS Y PLAQUETARIOS DE LA COAGULACIÓN

NÚMERO DEL FACTOR	NOMBRE (SINÓNIMO)
I	FIBRINÓGENO
II	PROTROMBINA
III	FACTOR TISULAR (TROMBOPLASTINA)
IV	ION CALCIO
V	PROACELERINA (FACTOR LÁBIL)
VI	—
VII	FACTOR ESTABLE (PROCONVERTINA)
VIII	FACTOR ANTIHEMOFÍLICO (GLOBULINA ANTIHEMOFÍLICA)
IX	COMPONENTE TROMBOPLASTÍNICO DEL PLASMA
X	FACTOR STUART
XI	ANTECEDENTE TROMBOPLASTÍNICO DEL PLASMA
XII	FACTOR DE HAGEMAN
XIII	FACTOR ESTABILIZANTE DE FIBRINA
FACTORES PLAQUETARIOS	
I	ACELERADOR PLAQUETARIO
II	ACELERADOR DE TROMBINA
III	FACTOR TROMBOPLÁSTICO PLAQUETARIO
IV	—

flejos nerviosos y por sustancias químicas. Por ejemplo, durante la formación del tapón plaquetario, las plaquetas liberan tromboxano, derivado de las prostaglandinas, y las células endoteliales liberan el péptido endotelina.

- Formación del tapón plaquetario

Cuando se daña un vaso, suele ocurrir rasgadura del endotelio y exposición del colágeno. Las plaquetas se adhieren a las fibras colágenas y liberan ADP, tromboxano y sustancias que participan en la coagulación como el fibrinógeno. El ADP promueve la agregación de las plaquetas, el tromboxano induce su propia liberación y la de más ADP y otras sustancias por las plaquetas en agregación, de modo que una vez que estas comienzan a adherirse y liberar sustancias químicas, un número cada vez mayor de ellas entra en el proceso de adhesión y libera-

ción. La adhesión plaquetaria requiere la presencia del factor von Willebrand y de los receptores IIb/IIIa y Ib/IX (4), la masa acumulada resultante constituye el tapón plaquetario. El principal evento en la fase terminal de agregación plaquetaria es la interacción del receptor glicoproteico GP IIb/IIIa con la secuencia adhesiva Arg-Pro-Asp (RGD) del fibrinógeno (5). Las reacciones plaquetarias son inducidas por la trombina mediante la activación de la GP IIb/IIIa y por la fibrina vía su interacción con GP Ib. El factor von Willebrand es crucial en ambas reacciones y de esa forma constituye un factor obligatorio para la generación normal de trombina en presencia de las plaquetas (6).

- Coagulación

El espasmo vascular y los tapones plaquetarios no son suficientes para cerrar grandes lesiones vascu-

lares. Cuando un vaso es dañado de forma severa, a los mecanismos anteriores se suma la formación de un coágulo que detiene el escape de sangre de la circulación. La formación del coágulo depende de proteínas plasmáticas llamadas factores de la coagulación (Tabla I). Normalmente los factores de la coagulación se encuentran en estado inactivo y no producen coágulos, ellos se activan cuando se produce algún tipo de daño. Esta activación es un proceso complejo que requiere varias reacciones químicas con la participación de iones Ca^{2+} y fosfolípidos plaquetarios.

El proceso de activación de los factores de la coagulación se puede delinear en tres etapas:

Primera. Formación de protrombinasa.

Segunda. Conversión de protrombina en trombina por la protrombinasa.

Tercera. Conversión del fibrinógeno soluble en fibrina insoluble.

Se han descrito dos vías independientes de la coagulación, en dependencia del modo en que se forma la protrombinasa en la primera etapa: se trata de las vías extrínseca e intrínseca de la coagulación (Fig. 1).

Vía extrínseca

Se inicia por sustancias químicas externas con relación a la sangre. En la etapa 1 los tejidos dañados liberan una mezcla de fosfolípidos y lipoproteínas llamada factor tisular (FT), también conocida como tromboplastina o factor III. El FT en presencia de iones Ca^{2+} forma un complejo con el factor VII, el cual activa al factor X. Sobre la superficie de las plaquetas el factor X activado, el factor V, el Ca^{2+} y los fosfolípidos plaquetarios forman un complejo denominado protrombinasa. En la etapa 2 la proteína soluble protrombina es convertida en la enzima trombina por la protrombinasa. Durante la tercera etapa el fibrinógeno soluble es transformado por la trombina en fibrina insoluble. La fibrina forma la red fibrosa del coágulo. La trombina también estimula la activación del factor XIII, necesario para la estabilización del coágulo.

Vía intrínseca

Es denominada así debido a que se inicia con sustancias que son intrínsecas o propias de la sangre. En la etapa 1, el daño a los vasos sanguíneos puede exponer el colágeno en el tejido conectivo que yace debajo del endotelio. Cuando el factor XII entra en contacto con el colágeno se activa y estimula al factor XI, que así activa al factor IX. El factor IX activado se une con el factor VIII, con fosfolípidos plaquetarios, e iones Ca^{2+} para activar al factor X. Sobre la superficie plaquetaria, el factor X activado, el

factor V, los fosfolípidos plaquetarios, y los iones calcio forman la protrombinasa. Las etapas 2 y 3 son comunes a las dos vías.

Aunque se consideraron en un tiempo vías separadas, hoy se conoce que la vía extrínseca puede activar proteínas de la intrínseca. El complejo FT/VII de la vía extrínseca puede estimular la formación de los factores IX y X activados en la vía intrínseca. Cuando los tejidos reciben daño, el FT conduce a la formación rápida de trombina, la que puede activar muchas de las proteínas de la vía intrínseca como el factor XI y la protrombinasa. De modo que la trombina es parte de un sistema de retroalimentación positiva en el que su presencia estimula su producción adicional. La trombina también estimula la activación plaquetaria.

Fisiología

La fibrina (FN) es el componente principal de los coágulos fisiológicos (los que taponean las brechas creadas en los vasos sanguíneos y evitan el escape de sangre del espacio vascular) y de los trombos patológicos (que ocluyen el lumen vascular limitando el flujo sanguíneo a los tejidos distales a la oclusión). La FN de los trombos patológicos es el "blanco" de los agentes trombolíticos utilizados en la práctica clínica. Lamentablemente la FN de los

coágulos fisiológicos también es disuelta por estos agentes, lo que puede conducir a la ocurrencia de sangramientos en áreas vasculares que no han sanado completamente.

La FN deriva de una proteína plasmática soluble, el fibrinógeno (FNG), compuesto de dos subunidades idénticas, cada una constituida por tres cadenas proteicas (alfa, beta y gama) (7), estas dos subunidades están unidas centralmente, formando el dominio E de la molécula de FNG (Fig. 2). Del dominio E se extienden dos "brazos" que terminan en los dominios D. Estos brazos contienen sitios de unión para el plasminógeno (PLG), el precursor inactivo de la enzima que disuelve a la FN, la plasmina (PLM). El FNG en la circulación, en cierta medida se encuentra formando complejos con el PLG a través de estos sitios de unión, como se verá más adelante.

También se extienden del dominio E pequeños componentes peptídicos de las cadenas α , β y γ . Los péptidos derivados de las cadenas α y β (fibrinopéptidos A y B) son separados de la molécula por la trombina en el proceso de conversión del FNG en FN. La molécula formada una vez que se han eliminado estos fibrinopéptidos se nombra fibrina monomérica.

Los monómeros de FN se mantienen solubles hasta que interactúan con otros monómeros y for-

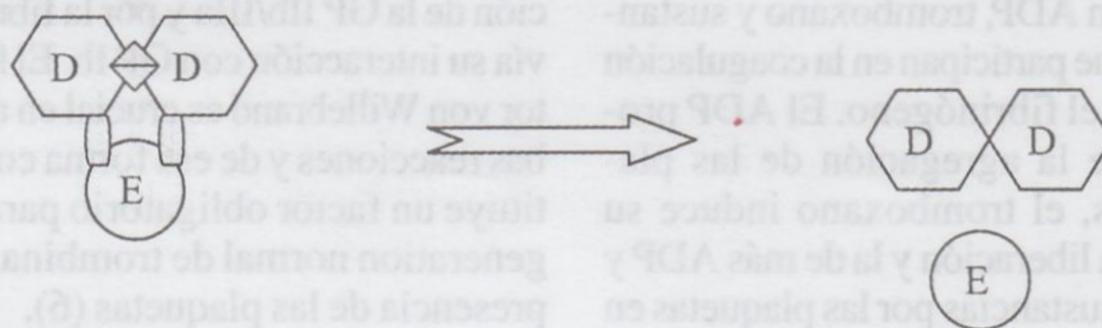


Figura 2. Estructura básica de la fibrina. El producto final de la degradación de la trama de fibrina por la plasmina es un dímero de dominios D ensamblados covalentemente en complejo no covalente con un dominio E [(DD)E]. Los enlaces no covalentes se degradan espontáneamente, quedando el fragmento E libre y su dímero D circulando en el plasma.

TABLA II

GENERACIONES DE ACTIVADORES DEL PLASMINÓGENO APROBADOS PARA SU EMPLEO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

PRIMERA GENERACIÓN	SEGUNDA GENERACIÓN	TERCERA GENERACIÓN
ESTREPTOQUINASA (SK)	ACTIVADOR TISULAR DEL PLG (t-PA, ALTEPLASA)	t-PA-RETEPLASA
UROQUINASA (UK)	COMPLEJO ACTIVADOR SK-PLG ANISOILADO (APSAC)	t-PA-TNK
	PRO-UROQUINASA (scu-PA)	t-PA-LANOTEPLASA (n-PA)
		ACTIVADOR DEL PLG DE LA SALIVA DE MURCIÉLAGO (b-PA)
		ESTAFILOQUINASA (STK)

man polímeros. Los polímeros se forman por la interacción no covalente entre el dominio E de un monómero y los dominios D de otros dos, estas interacciones son débiles y la FN formada posee poca fuerza y estabilidad. El factor XIII, después de ser activado por la trombina establece el entrecruzamiento covalente entre monómeros adyacentes, principalmente entre dominios D adyacentes. Estos enlaces covalentes confieren fuerza y estabilidad química al trombo de fibrina. El plasminógeno, originalmente en complejo con el fibrinógeno, resulta incorporado al trombo cuando el FNG es convertido en FN.

CONTROL DE LA FORMACIÓN DE COÁGULOS

En circunstancias normales, el balance en el sistema de coagulación favorece la anticoagulación. La trombina es la enzima efectora clave de la cascada de coagulación. Los antagonistas de la vitamina K inhiben la modificación post-traduc-

ional de varias proteínas de la coagulación requerida para que estas adquieran la conformación que las capacite para unirse a fosfolípidos. La heparina estimula la actividad de la antitrombina III (ATIII), un inhibidor de serin-proteasas. Análisis de ratones knock-out han demostrado la importancia de los factores de la coagulación in vivo (8).

Si no existiera control de la coagulación esta se extendería a toda la circulación una vez activada. Para prevenir la coagulación excesiva, la sangre contiene anticoagulantes. Sólo cuando la concentración de los factores de la coagulación excede cierto umbral, ocurre la coagulación. Se forman tantos factores en el sitio del daño que los anticoagulantes son incapaces de evitar la formación del coágulo. Lejos de este sitio, sin embargo los factores se encuentran diluidos, de modo que los anticoagulantes pueden neutralizarlos y evitar la coagulación.

Ejemplos de anticoagulantes naturales son la ATIII, la heparina y la

prostaciclina. La antitrombina es una proteína plasmática producida por el hígado que inactiva lentamente a la trombina. La heparina, producida por basófilos y células endoteliales, incrementa la efectividad de la antitrombina porque juntas inactivan la trombina de modo rápido. La prostaciclina es un derivado de las prostaglandinas producido por las células endoteliales, contrarresta los efectos de la trombina causando vasodilatación e inhibiendo la liberación de factores de la coagulación por las plaquetas. Participan también en la prevención de coagulación excesiva las proteínas S y C (PS, PC) así como la vía de inhibición del factor tisular (9). La PC a través de su acción anticoagulante bloquea la formación de trombina en la cascada de la coagulación y así suprime el retardo en la fibrinólisis, es también dependiente de la presencia de iones Ca^{2+} . La proteína S es un factor de la coagulación no enzimático dependiente de vitamina K que participa en la regulación de la proteína C activa-

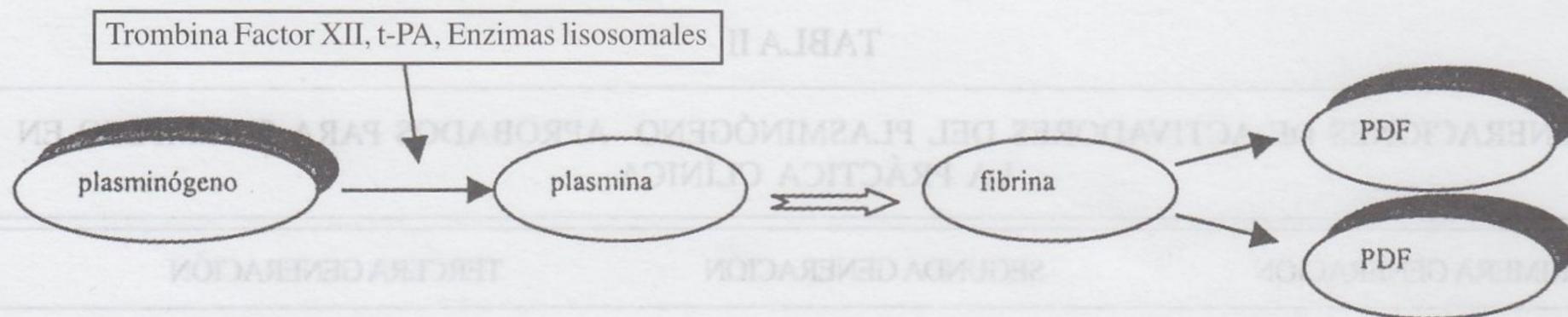


Figura 3. Activación y acción catalítica de la plasmina. El proceso de degradación de la fibrina por la plasmina es estimulado por los activadores del plasminógeno como el activador tisular (t-PA) y por otras moléculas como la trombina, el factor XII y las enzimas lisosomales. La disolución de la fibrina de los coágulos se puede monitorear a través de los productos de degradación generados (PDF), éstos permiten además diferenciar el origen de la fibrina degradada. Aquí se señalan sombreados el plasminógeno precursor y los productos de degradación como elementos sin actividad enzimática.

da, también se le reconoce actividad inhibitoria de protrombinasa en células endoteliales y plaquetas mediada por unión a los factores Va y Xa. La proteína C activada es una proteasa que inactiva al factor VIIIa mediante corte del enlace Arg₅₆₂ (subunidad A2), actividad que es estimulada por la presencia de proteína S (10).

Uno de los principales mecanismos regulatorios de la cascada de la coagulación es la vía anticoagulante trombomodulina-proteína C, que consta de la trombina, la trombomodulina, la proteína C y la proteína S, y se inicia cuando la PC circulante en forma de zimógeno es convertida en PC activada (PCA) por el complejo trombina-trombomodulina en la superficie de las células endoteliales. La PCA formada en presencia de su cofactor PS, inhibe la cascada de coagulación por inactivación proteolítica de los factores procoagulantes Va y VIIIa y también estimula el sistema fibrinolítico por inhibición del inhibidor del activador del plasminógeno PAI-1. La PS circula en plasma en dos formas en equilibrio dinámico, una es la proteína libre (aproximadamente 40% de la PS total en plasma normal) que posee actividad cofactora de PCA; la otra es la que forma complejo reversible con la proteína de unión al factor del complemento C4 (C4bp), un componente regulatorio

del sistema del complemento. Cuando está unida a C4bp, PS no puede funcionar como cofactor de PCA, como la formación del complejo está regulada por la ley de acción de masas, la elevación de C4bp reduce los niveles de PS libre (activa).

Las evidencias clínicas de que estos factores regulatorios funcionan como anticoagulantes naturales deriva de la observación de que los pacientes con déficit congénito de cada factor sufren severa trombosis venosa y arterial.

El coágulo usualmente es disuelto en pocos días por un proceso llamado fibrinólisis con la acción de la plasmina, una enzima que hidroliza la fibrina. La plasmina se forma a partir del plasminógeno inactivo que es una proteína normal del plasma que es activada por la trombina, el factor XII, el activador tisular del plasminógeno y por enzimas lisosomales liberadas de tejidos dañados (Fig. 3) (11).

Mecanismo molecular de la fibrinólisis

La conversión del PLG en la enzima proteolítica PLM es un paso esencial para el inicio de la fibrinólisis. Esta activación puede ocurrir tanto con el PLG asociado a FN o a FNG, como con el que está libre en el plasma. La plasmina actúa rompiendo los enlaces entre los domi-

nios D y E ya sea de FN o de FNG, el resultado final de la degradación del FNG es la obtención de los dominios D y E libres. Los productos finales de la degradación de la trama de FN son los dominios E y los dominios D entrelazados de monómeros de fibrina adyacentes (dímeros-D). Mientras que los dominios E y D libres en plasma pueden ser resultado de la degradación de fibrinógeno o de los monómeros de fibrina, la presencia de dímeros D en plasma significa degradación de la fibrina polimérica entrelazada, lo que representa el producto final de la disolución de un trombo patológico o de un coágulo fisiológico (12).

La fibrinólisis fisiológica es regulada por interacciones moleculares específicas. La hipótesis más aceptada plantea que el activador endógeno del plasminógeno posee una débil afinidad por este en ausencia de FN ($K_m=65 \mu M$), que se incrementa en presencia de esta (K_m entre 0.15 y 1.5 μM). El incremento de afinidad ocurre como resultado de un "ensamblaje superficial" del activador con el PLG en la superficie de la FN. En esta reacción el PLG se une primero a la FN a través de los sitios de unión por lisina (SUL). Por tanto, aquí ocurre regulación a nivel de la activación del PLG en la superficie de la FN. La PLM es inactivada rápidamente por la α_2 -anti-

plasmina ($K_i \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$); el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la PLM en circulación se estima sea de 0.1 segundos, la inactivación ocurre a una velocidad 50 veces menor si los SUL de la PLM están ocupados. El bloqueo reversible del sitio activo de la plasmina por el sustrato también reduce el nivel de inactivación. A partir de estos hallazgos se ha podido deducir que las moléculas de PLG generadas sobre la superficie de la FN están preservadas de la inactivación rápida por $\alpha 2$ -antiplasmina.

Todos los agentes fibrinolíticos actualmente en uso actúan convirtiendo el plasminógeno en plasmina, en la circulación y/o en la superficie del trombo. Los activadores del plasminógeno

que entran en la circulación encuentran inhibidores específicos. En dosis clínicas los inhibidores son desplazados. Los activadores que escapan a la neutralización por sus inhibidores específicos, interactúan con el PLG de la superficie del trombo, el que está libre en circulación o ambos, esta interacción en última instancia convierte el PLG en PLM.

La plasmina libre en circulación es inactivada rápidamente por su inhibidor específico, la $\alpha 2$ -antiplasmina. Solo luego de haberse consumido toda la $\alpha 2$ -antiplasmina es que se puede generar PLM libre en la circulación. Puesto que la concentración de PLG en plasma es dos veces la de $\alpha 2$ -antiplasmina esto puede ocurrir

después de administradas altas dosis de activador. La plasmina libre en circulación degrada proteolíticamente a la fibrina, pero también al fibrinógeno y otros factores de la coagulación, principalmente a los factores V y VIII. La plasmina generada en la superficie del trombo no es inhibida eficientemente por la $\alpha 2$ -antiplasmina y puede iniciar la degradación de la FN rápidamente.

Este modelo molecular de regulación de la fibrinólisis ha tenido importante repercusión para el desarrollo de activadores del PLG para su empleo como agentes trombolíticos en la terapia de trastornos que cursan con la ocurrencia de trombosis (Tabla II).

REFERENCIAS

1. Hamada J, Mizuno T, Kai Y, Morioka M, Ushio Y (2000) Microcatheter intrathecal urokinase infusion into cisterna magna for prevention of cerebral vasospasm: preliminary report. *Stroke Sep*; 31(9):2141-8.
2. Bahlmann F, Hofmann M, Meyer K, Schinzel H, Merz E, Trautmann K (2000) Diagnosis and therapy of leg and pelvic deep vein thrombosis in pregnancy. *Zentralbl Gynakol* 122(7):374-82.
3. Kasner S E, Villar-Cordova C E, Tong D, Grotta J C (1998) Hemopericardium and cardiac tamponade after thrombolysis for acute ischemic stroke. *Neurology. Jun*; 50(6): 1857-9.
4. Triplett D A (2000) Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem Aug*; 46(8 Pt 2):1260-9.
5. Pastorova V E, Liapina L A, Cherkasova K A, Ashmarin I P (1999) Peptides as inhibitors of thrombin coagulation activity and of thrombocyte aggregation. *Usp Fiziol Nauk Apr-Jun*; 30(2):80-91.
6. Beguin S, Keularts I (1999) On the coagulation of platelet-rich plasma. Physiological mechanism and pharmacological consequences. *Haemostasis Sep*; 29(1):50-7.
7. Doolittle R F (1984) Fibrinogen and fibrin. *Ann Rev Biochem* 53:195-229.
8. Dahlback B (2000) Blood coagulation. *Lancet May 6*; 355(9215):1627-32.
9. Tideman P A (1999) Antithrombins and the importance of good control. *Aust N Z J Med Jun*; 29(3):444-51.
10. Ten Cate H (2000) Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Crit Care Med Sep*; 28 (9 Suppl): S9-11.
11. Smith B J (1999) Thrombolysis in acute myocardial infarction: analysis of studies comparing accelerated t-PA and streptokinase. *J Accid Emerg Med Nov*; 16(6):407-11.
12. Naito M (2000) Effects of fibrinogen, fibrin and their degradation products on the behaviour of vascular smooth muscle cells. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi Jun*; 37(6):458-63.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Ricardo Jasso Chávez
 Instituto Nacional de Cardiología
 "Ignacio Chávez"
 e-mail: rjasso@hotmail.com

TEMA: Cinética enzimática. Efecto de la temperatura

El aumento en la temperatura incrementa la actividad de las enzimas hasta un valor en donde empieza a prevalecer la desnaturalización. Mientras que la variación en la velocidad (V_m o k_{cat}) debida a la temperatura se analiza frecuentemente en las enzimas, la variación de la afinidad por el sustrato ha sido menos estudiada (K_m).

La temperatura es una de las variables ambientales más importantes que establece los límites de viabilidad en los organismos. Para comparar la estabilidad enzimática

en organismos expuestos a diferentes temperaturas, se determinó el efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos de la 3-fosfoglicerato cinasa presente en una bacteria mesofílica (*Zymomonas mobilis*) y en una termofílica (*Thermoanaerobacter sp*). La reacción se ensayó en la dirección de la formación de 1,3-bisfosfoglicerato, acoplado la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Por lo tanto, la actividad enzimática se monitoreó midiendo la desaparición de NADH. La mezcla de reacción se incubó durante 10-15 s y la reacción se midió en los primeros 5 s [1].

Los resultados fueron los siguientes:

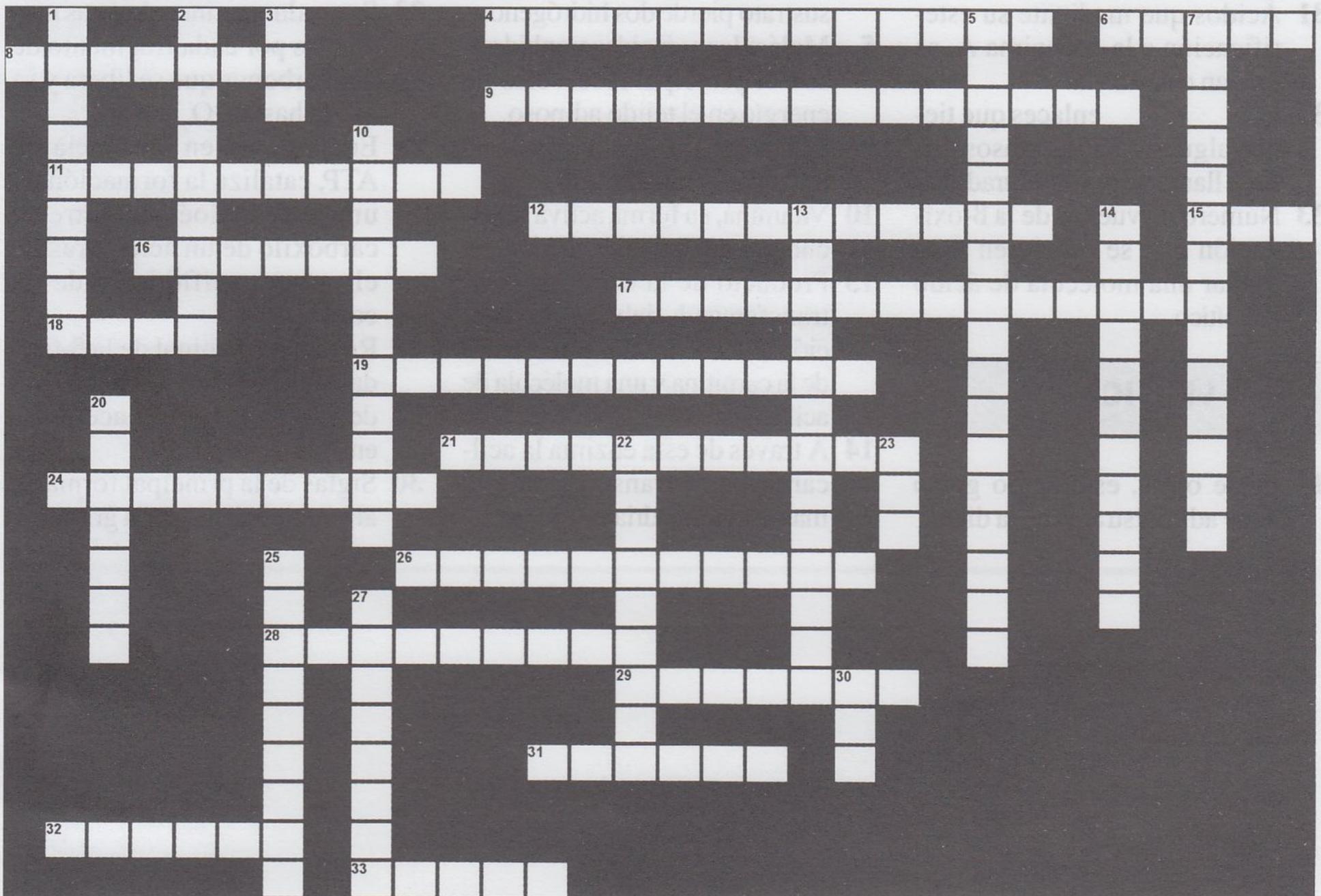
<i>Zymomonas mobilis</i>			<i>Thermoanaerobacter sp</i>		
Temperatura (°C)	V_m (nmol NADH/min/mg)	K_m (mM) (3PG)	Temperatura (°C)	V_m (nmol NADH/min/mg)	K_m (mM) (3PG)
20	280	1.0625	40	700	0.75
25	340	0.9375	45	800	0.875
30	400	1.0	50	925	0.9375
35	480	1.0625	55	1100	1.00
40	550	—	60	1250	1.0625
45	625	1.125	65	1500	1.125
50	700	1.1875	70	1650	1.25
55	800	1.3125	75	1650	
60	850	1.625	80	1600	
65	1000				
70	950				
75	875				

Determinar la energía de activación y los parámetros termodinámicos ΔG° a 30°C, ΔH° y ΔS° para la disociación del complejo Enzima-3PG (suponiendo que la enzi-

ma presenta una cinética en equilibrio rápido) a partir de los valores de K_m . Discutir las diferencias observadas en la 3-fosfoglicerato cinasa entre los dos organismos.

CRUCIBIOQ

Yolanda Saldaña Balmori

β-OXIDACIÓN**HORIZONTALES**

- 4** Intermediario activado que se forma cuando el ácido graso se activa en presencia de ATP.
- 6** Número de átomos que un ácido graso debe tener para que un producto de la oxidación sea propionil coenzima A.
- 8** Llamada también β-cetotilasa, elimina de la acil coenzima A dos átomos de carbono.
- 9** Ciclo de ácidos en el que son procesados los residuos carbonados de la β-oxidación.
- 11** Es el ácido 9, 12, 15 octadecatrienoico.
- 12** Cadena en la que son oxidados los productos reducidos de la β-oxidación.
- 15** Se reduce en esta vía al igual que un derivado de la flavina.
- 16** Aportan aproximadamente el 30 % de las calorías de la dieta y proporcionan 9 kcal/g de energía útil.
- 17** Enzima que acoplada al NAD, convierte hidroxiacil coenzima A en cetoacil coenzima A.
- 18** Número de residuos de acetyl coenzima A que se obtienen por la oxidación del ácido palmítico.
- 19** Es el ácido Δ 5, 8, 11,14 eicosatetraenoico.
- 21** Organelo subcelular donde se lleva a cabo la oxidación de los ácidos grasos.
- 24** En presencia de este compuesto, los ácidos grasos de cadena larga son transportados a través de la membrana interna mitocondrial.
- 26** Vitamina que forma parte de la coenzima A la cual interviene en la activación de los ácidos grasos.
- 28** A partir de algunos lípidos, en este proceso se obtienen NADH, FADH₂ y moléculas de

- dos carbonos activados con coenzima A.
- 29** Esterificado a coenzima A es el producto final de la β -oxidación.
- 31** Ácidos que mediante su esterificación a la coenzima A, se oxidan en esta vía.
- 32** Los _____ enlaces que tienen algunos ácidos grasos, los hace llamarse poliinsaturados.
- 33** Número de vueltas de la β -oxidación que se requieren para oxidar una molécula de ácido palmítico.
- 2** Cuando se numeran los carbonos de un ácido graso, éste es el número uno.
- 3** Grupo prostético de la acil coenzima A deshidrogenasa, el sustrato pierde dos hidrógenos.
- 5** Moléculas reducidas y anhidras, son el principal reservorio de energía en el tejido adiposo.
- 7** Ácido graso esencial con dos o más dobles ligaduras.
- 10** Vitamina, su forma activa se encuentra en el FMN y FAD.
- 13** Producto de la carnitina acil-transferasa 1, debido a la reacción citosólica entre el hidroxilo de la carnitina y una molécula de acil coenzima A.
- 14** A través de esta enzima la acil-carnitina es transportada a la matriz mitocondrial.
- 20** Vitamina que forma parte del nicotín adenín dinucleótido.
- 22** Nombre trivial de la enzima que introduce una molécula de agua en la vía de la β -oxidación.
- 23** Se producen cinco de estas moléculas por cada fragmento de dos carbonos que se libera y se oxida hasta CO_2 y H_2O .
- 25** Enzima que en presencia de ATP, cataliza la formación de una unión tioéster entre el carboxilo de un ácido graso y el grupo sulfhidrilo de la coenzima A.
- 27** Reacción terminal de la β -oxidación que permite la liberación de una molécula de acetyl coenzima A.
- 30** Siglas de la principal forma de almacenamiento de la grasa.

VERTICALES

- 1** Entre otros, este ácido graso debe administrarse en la dieta.

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

RESULTADOS:

La velocidad de una reacción enzimática depende de la frecuencia de colisiones entre las moléculas reactantes (enzima + sustrato). La energía mínima para que una colisión genere una reacción es la *energía de activación* (E_a).

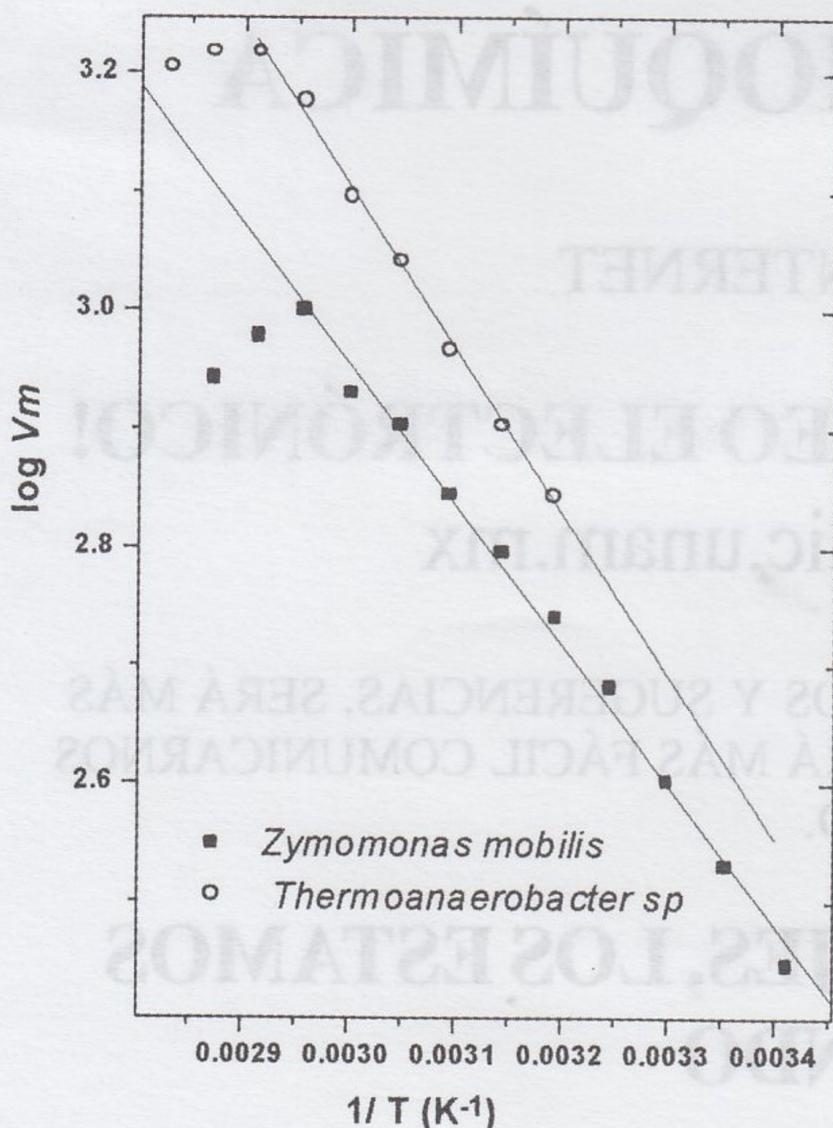
La cual puede determinarse mediante la ecuación de Arrhenius:

$$v = v_0 e^{-E_a/RT} \text{ o en su forma lineal:}$$

$$\log v = \log v_0 - E_a / 2.3 RT,$$

donde v es la velocidad obtenida a cada temperatura de ensayo, v_0 es la velocidad máxima teórica si el número total de colisiones entre los reactantes fueran productivas a una temperatura infinita, T es la temperatura absoluta y R es la constante de los gases.

De esta forma, si relacionamos el logaritmo de las velocidades contra el inverso de la temperatura absoluta a la cual fueron obtenidas obtenemos una gráfica como la siguiente:

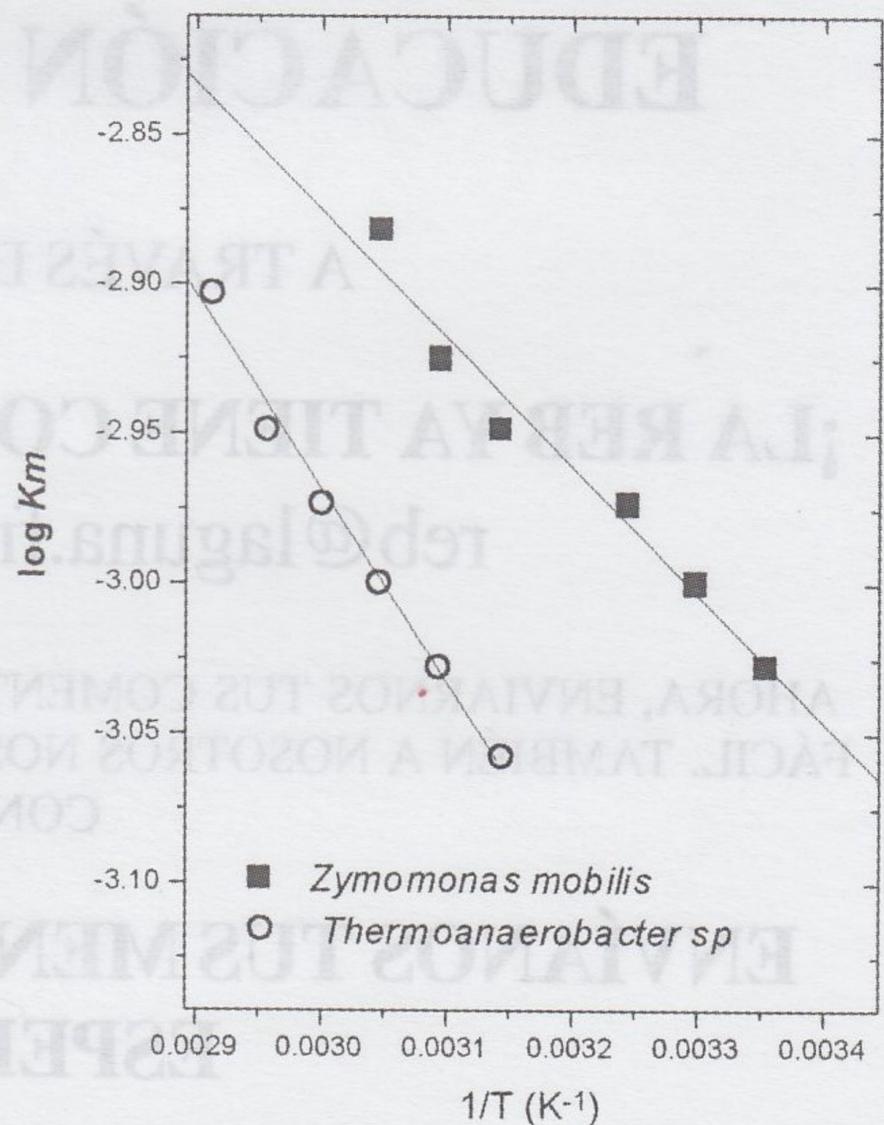


Así, el valor de la pendiente es igual $-E_a/R \cdot 2.3$, por lo que la E_a es de 5414 y 6301 cal/mol para las 3-fosfoglicerato cinasas de *Zymomonas mobilis* y de *Thermoanaerobacter sp.*, respectivamente. Es importante puntualizar en la figura, que el cambio en la pendiente es indicativo de la inactivación térmica, por lo que estos puntos ya no se toman en cuenta para el cálculo de la E_a .

Suponiendo que la reacción catalizada por la 3-fosfoglicerato cinasa establece un equilibrio rápido para la asociación del sustrato ($K_m = K_s$), entonces las K_m s obtenidas a diferentes temperaturas se puede utilizar para calcular los parámetros termodinámicos de acuerdo a la siguiente ecuación [2]

$$\log K_m = -\Delta H^\circ / 2.3 RT + \Delta S^\circ / 2.3 R,$$

donde ΔH° es el cambio en la entalpía estándar, ΔS° es el cambio en la entropía estándar de la disociación del complejo enzima-sustrato y R es la constante de los gases. Entonces, con la línea recta obtenida del gráfico del $\log K_m$ contra el inverso de la temperatura absoluta,



podemos calcular ΔH° a partir del valor de la pendiente y ΔS° de la ordenada al origen. El ajuste de los datos experimentales a una línea recta indica que la suposición de equilibrio rápido es razonable para esta enzima.

De esta forma, los valores de ΔH° fueron +1956 y +2960 cal/mol; y los de ΔS° de -7.29 y -4.7 cal/mol K, para *Zymomonas mobilis* y *Thermoanaerobacter sp*, respectivamente. Estos valores de cambio de entalpía y entropía indican que la disociación del complejo cinasa-3PG es un proceso endergónico con una disminución en la entropía.

Finalmente con la ecuación del cambio de la energía libre:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ,$$

podemos calcular el cambio en la energía libre de la reacción (ΔG°). En este caso el ΔG° a 30 °C es de +4.17 y +4.4 Kcal/mol para las enzimas de *Zymomonas mobilis* y *Thermoanaerobacter sp*, respectivamente.

El valor positivo en la energía libre de Gibbs para la disociación a 30°C indica que la asociación entre la enzima y el sustrato está termodinámicamente favorecida independientemente del organismo del cual provenga.

El aumento en la actividad de la 3-fosfoglicerato cinasa de *Thermobacter* con respecto a la contraparte mesofílica, es un caso contrario a la observación normal que las enzimas termofílicas son menos activas que las mesofílicas a una temperatura dada [1]. Sin embargo, las *Ea* para cada una de las enzimas fue muy similar, lo que indica que la termodinámica de una reacción enzimática no se modifica a pesar de la temperatura del ambiente en el cual se desarrolle un organismo sino a la naturaleza conservada de esta enzima.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thomas, T., M., and Scopes, R. K. (1998). Biochem. J. 330, 1087-10
2. Segel, I., H. (1975) Enzyme kinetics. Cap. 11, pp 926-935. John Wiley & Sons.

YA PUEDES COMUNICARTE CON LA REVISTA DE

EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

A TRAVÉS DE INTERNET

¡LA REB YA TIENE CORREO ELECTRÓNICO!

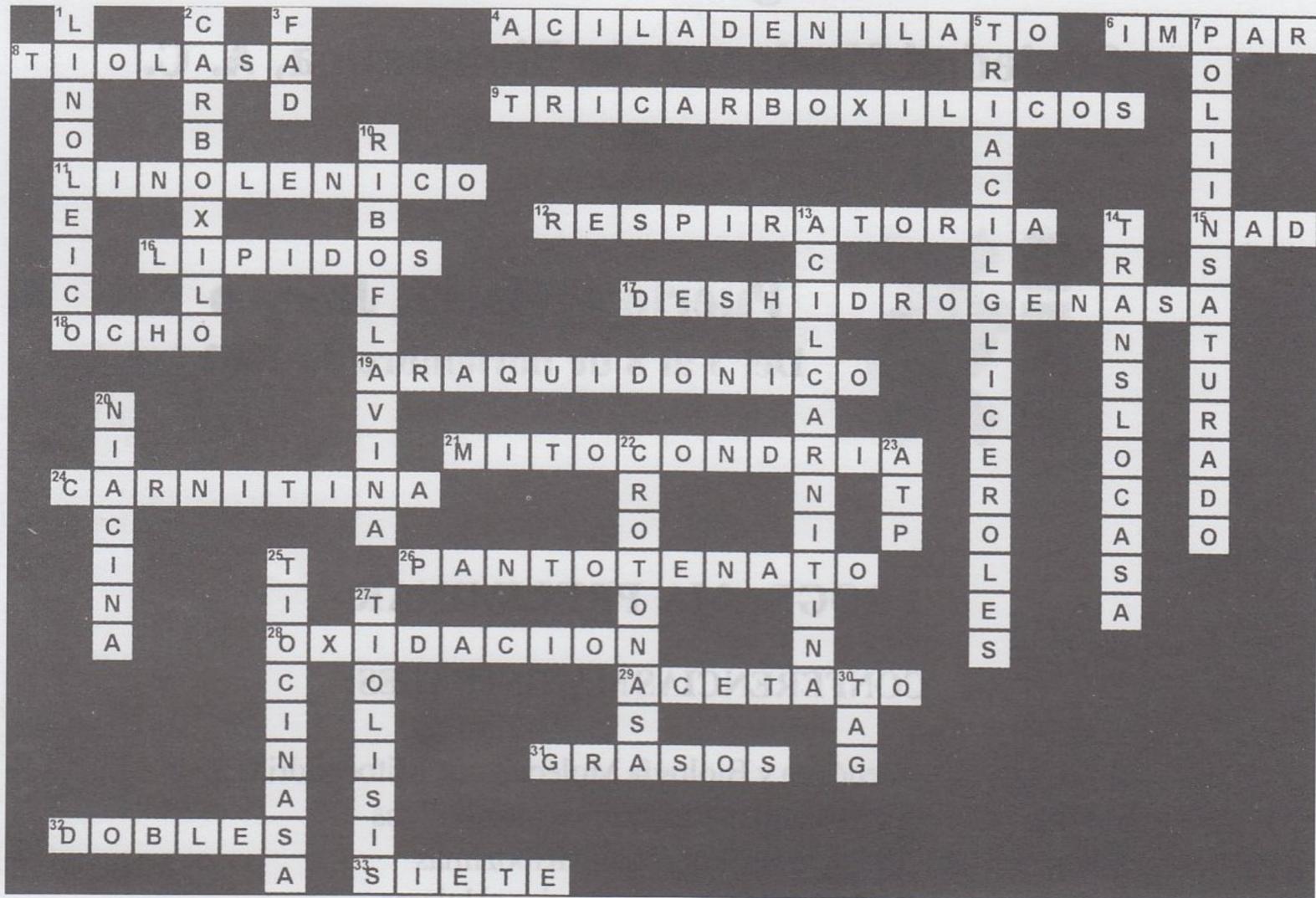
reb@laguna.fmedic.unam.mx

AHORA, ENVIARNOS TUS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS, SERÁ MÁS FÁCIL. TAMBIÉN A NOSOTROS NOS SERÁ MÁS FÁCIL COMUNICARNOS CONTIGO.

ENVÍANOS TUS MENSAJES, LOS ESTAMOS ESPERANDO

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ

β-OXIDACIÓN



ÁREAS DE INVESTIGACIÓN PARA LOS RESÚMENES DEL XXIV CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA

- | | |
|--|---|
| E. Biología molecular de mamíferos | F. Genética |
| G. Bases moleculares de alteraciones genéticas | A. Regulación de la expresión genética |
| J. Estructura y función de macromoléculas (Est. Fun. Molec.) | B. Biología molecular de plantas |
| A. Péptidos y neuropéptidos | C. Biología molecular de la interacción planta microorganismo |
| B. Fisiopatología de macromoléculas | D. Bioquímica y biología molecular de parásitos |
| | E. Biología molecular de virus |

Simposios Plenarios sobre: Estado Redox, Educación Bioquímica, Transducción de Señales, Genética, Biofísica, Bioquímica de la Memoria, Biogénesis de Organos, Metabolismo Humano y Evolución, Radicales Libres y Estructura y Función de Membranas, Mecanismos de Transducción de Señales, Síntesis de Macromoléculas, Bioquímica y Fisiología de Parásitos, Estructura y Función de Membranas, Mecanismos de Transducción de Señales, Síntesis de Macromoléculas, Bioquímica y Fisiología de Parásitos.

CONVOCATORIA

XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.



Puerto Vallarta, Jalisco
Del 3 al 8 de noviembre de 2002

PROGRAMA PRELIMINAR

CONFERENCIAS MAGISTRALES:

T. Fox	Genética y Biología Molecular de Mitocondrias
D. Valle	Peroxisomas y trastornos metabólicos
A. Ferré	Estructura y Función de Ribozimas
G. Pollak	Células, geles y maquinarias celulares
M. Cerejido	Determinación del destino proteico en eucariontes

Simposios Plenarios sobre:

Ciclo Celular, Biofísica, Bioquímica de la Memoria, Biogénesis de Organelos, Metabolismo Humano y Enfermedad, Genómica y Evolución, Radicales Libres y Estados Redox, Educación Bioquímica, Transducción de Señales.

Simposios Simultáneos:

Genética, Estructura y Función de Membranas, Metabolismo, Inmunología, Transducción Sináptica, Desarrollo y Diferenciación Celular, Estructura y Función de Macromoléculas, Bioquímica y Fisiología de Parásitos.

ÁREAS DE INVESTIGACIÓN PARA LOS RESÚMENES DEL XXIV CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA

1. Genética

- A. Regulación de la expresión genética
- B. Biología molecular de plantas
- C. Biología molecular de la interacción planta microorganismo
- D. Bioquímica y biología molecular de parásitos
- E. Biología molecular de virus

- F. Biología molecular de mamíferos
- G. Bases moleculares de alteraciones genéticas

2. Estructura y Función de Macromoléculas (Est. Fun. Macro.)

- A. Péptidos y neuropéptidos
- B. Fisicoquímica de macromoléculas

- C. Purificación de proteínas
D. Estructura de proteínas
- 3. Estructura y Función de Biomembranas (Est. Fun. Membr.)**
A. Bioenergética
B. Transporte a través de membranas
C. Fisicoquímica de membranas
D. Transducción de señales
- 4. Bioquímica y Fisiología de Microorganismos (Bioq. Fisiol. Micro.)**
A. Virus
B. Bacterias
C. Hongos
D. Parásitos
- 5. Desarrollo y Diferenciación Celular (Des. Dif. Cel.)**
A. Citoesqueleto
B. Interacciones de la matriz celular
- C. Cáncer
D. Control de la muerte celular (apoptosis)
- 6. Inmunología**
A. Hipersensibilidad y alergia
B. Citocinas
C. Vacunas
D. SIDA e infecciones virales
E. Enfermedades autoinmunes
- 7. Metabolismo y bases moleculares de la función celular**
A. Del carbono y del nitrógeno
B. De nutrientes y vitaminas
C. Metabolismo secundario en plantas
D. Radicales libres, antioxidantes e isquemia
E. En enfermedades
- 8. Transmisión Sináptica y Neurobiología (Trans. Sin. Neuro.)**

EL COMITÉ ORGANIZADOR DEL XXIV CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA MESA DIRECTIVA 2001-2003

Dr. Heliodoro Celis Sandoval
Tel.: 5622-5667; Fax: 5616-2282
hcelis@ifisiol.unam.mx

Dr. Rolando Hernández
Tel.: 5622-5666, Fax: 5622-5611,
rhernand@ifisiol.unam.mx

Dr. Antonio Velázquez Arellano
Tel.: 56-06-3489, Fax: 5606-3558
alpizar@servidor.unam.mx

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Tel. 5622-5609, Fax: 56-22-56-22
azentell@ifisiol.unam.mx

DUDAS O COMENTARIOS

En caso de tener alguna duda o comentario, por favor comuníquese con la Sra. Guadalupe Ramírez, a los teléfonos 5622-5603 y 5622-5604, Fax: 616-22-82, o al correo electrónico secdir@ifisiol.unam.mx, con gusto lo atenderemos.

Para información, visite la página en Internet de la Sociedad Mexicana de Bioquímica en la siguiente dirección: <http://www.ifisiol.unam.mx/smb/>



Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

CONVOCATORIA

*Investigadores
Estudiantes*

¡Envíen sus contribuciones científicas a

TIP REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

para su publicación!

TIP

REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, es una publicación periódica y con arbitraje, que difunde información científica sobre temas de botánica y zoología; ecología, microbiología, bioquímica, fisicoquímica, física, matemáticas, farmacia, química general, orgánica e inorgánica.

La revista es un foro para recibir trabajos de carácter interdisciplinario, escritos por investigadores científicos, pero también pretende cubrir un espacio como es el publicar los resultados de investigaciones de tesis de estudiantes de grado, debidamente asesorados, de cualquier institución, tanto nacional como internacional.

Se aceptan trabajos de investigación científica original e inédita, artículos breves, artículos de revisión, ensayos y notas científicas en español e inglés.

Las personas interesadas en la publicación de sus trabajos de investigación o que soliciten información complementaria, deberán dirigirse a:

PROGRAMA EDITORIAL

División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Batalla del 5 de Mayo, Esq. Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, C.P. 09230. Tel. y fax: 5773-6332; e-mail: revistatip@yahoo.com; terrones@fenix.ifisicacu.unam.mx (**DR. HUMBERTO TERRONES, EDITOR**).

CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C o suscriptor de la REB y vives fuera de la Ciudad de México, te invitamos a que seas corresponsal de nuestra revista en el sitio donde radiques.

Nos interesa contar con corresponsales adscritos a las Instituciones de Educación Superior en todos los estados de la República, así como en lugares de Centro y Sudamérica, España y otros sitios en donde la REB sea leída.

También nos interesa conocer y publicar las noticias más significativas que en nuestro campo ocurran en los diferentes lugares, ya sean seminarios, cursos, congresos, talleres, publicaciones, etc.

En el documento Normas del Comité Editorial, que es el que nos rige, hay un apartado para esta actividad, mismo que a continuación se transcribe:

5. DE LOS CORRESPONSALES

5. a) Los corresponsales de la REB son profesores y/o investigadores, que sin formar parte del Comité Editorial, coadyuvan en las actividades de la revista. El corresponsal debe ser un miembro sobresaliente de la comunidad académica local o regional. Es deseable un corresponsal en cada una de las Instituciones de Educación Superior de la República Mexicana, Centroamérica, Sudamérica y otras regiones de habla hispana.

5. b) Uno de los editores se encargará de la coordinación de los corresponsales y de la comunicación con ellos para lograr que los objetivos se cumplan. El puesto será rotatorio y se cambiará cada dos o cuatro años, de acuerdo con el Comité Editorial.

5. c) La proposición de corresponsales se hará, mediante documento firmado por cuando menos dos de los editores, que se acompañará con el *Curriculum Vitae* del candidato propuesto.

5. d) La discusión del ingreso de un corresponsal deberá realizarse después de que el Coordinador de Corresponsales haya circulado la información correspondiente y con la asistencia en pleno del Comité Editorial.

5. e) Para ser aceptado, el candidato deberá contar con la aprobación por consenso de los miembros del Comité Editorial.

5. f) En caso de ser admitido, se le hará una invitación formal a la que se anexarán estas normas. Iniciará sus actividades como corresponsal, al recibir el Editor en Jefe la aceptación escrita del candidato.

5. g) El Comité Editorial dará el crédito correspondiente a los corresponsales en la revista en el formato que el propio Comité decida.

5. h) La salida de un corresponsal puede ser por renuncia voluntaria, presentada por escrito, o bien por acuerdo del Comité Editorial, después de la evaluación de sus actividades.

5.1 RESPONSABILIDADES DE LOS CORRESPONSALES

5.1.a) Envío a través del Coordinador de Corresponsales de al menos una contribución propia o de su comunidad al año y de las noticias relevantes de su localidad o región.

5.1.b) Mantenimiento del archivo de los suscriptores de la REB de su localidad y comunicación inmediata de los cambios en él.

5.1.c) Colaboración en la promoción, difusión y distribución de la REB entre los miembros de su comunidad.

5.1.d) Colaboración en las promociones de financiamiento económico de la revista.

5.1.e) Elaboración y envío anual de un informe de sus labores que a través del Coordinador de Corresponsales se hará llegar al Comité Editorial junto con una crítica a los números correspondientes.

Por favor, dirige tu correspondencia a la Coordinadora de Corresponsales, Comité Editorial de la REB, Apartado Postal 70-281, México, 04510, DF, MÉXICO, o bien al Tel: (52) 5623-2168 / Fax: (52) 5616-2419.

email: balmori@laguna.fmedic.unam.mx

Yolanda Saldaña Balmori
Coordinadora de Corresponsales de la REB.

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

La REB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y de áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea clara y explícita. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Se solicita a los autores que revisen algunos de los últimos números de esta publicación para que vean estilo, tipos de abreviaturas, etc., así como que se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 1) El artículo deberá enviarse en un disco para computadora, escrito en los procesadores de textos "Winword" o "Word-perfect", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 caracteres por renglón). Éste deberá ir acompañado de tres impresiones del artículo y de la solicitud para su publicación, firmada por cada uno de los autores.
- 2) El trabajo debe iniciarse con el título del artículo, nombre de los autores, iniciando por nombre propio completo y marcado como pie de nota, la afiliación del o los autores (por ejemplo: departamento e institución), domicilio, código postal, ciudad, estado, país, teléfono, fax y correo electrónico en caso de tenerlos. Debe incluirse cuatro renglones más abajo, un título breve con un máximo de 60 caracteres, incluyendo los espacios, para insertarlo como cabeza de página.
- 3) Se deberá incluir un resumen en idioma español y uno en inglés, de más o menos diez renglones, que irán seguidos por conjuntos de tres a seis palabras clave.
- 4) Se sugiere un máximo de quince referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas entre paréntesis en el texto de forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada una debe contener: nombres de los autores, año de publicación entre paréntesis, título del artículo, nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen en cursivas y antecedido por dos puntos el número de la primera y última páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:

Fraga C G y Oteiza P I (1995) Vitaminas antioxidantes: Bioquímica, Nutrición y participación en la prevención de ciertas patologías. *Bol Educ Bioq* 14:12-17.

Weindruch R (1996) Caloric restriction and aging. *Sci Amer* 274:32-38.

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood K J (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The molecular biology of immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Wiley and Sons Ltd, pp 81-104.

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

Lehninger A L, Nelson D L y Cox M M (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 5) Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, figuras más tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o bien impresiones láser o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya

localización deberá estar señalada en el texto. La limitación en el número de figuras, de tablas y de referencias, obliga a los autores a que se seleccionen aquellas que sean realmente importantes e informativas. Las figuras se deberán numerar con arábigos y las tablas con romanos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán adicionar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán de tamaño, aproximadamente a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores a los dos milímetros. Las tablas se deberán presentar conforme alguna de las publicadas en los números de 1999. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá dársele el crédito correspondiente u obtener el permiso para su publicación. Las figuras dentro del texto deberán mencionarse con minúsculas, la palabra entera y sin paréntesis; cuando se haga referencia a ellas deberá citarse así (Fig. X) numerándolas con arábigos. Las tablas siempre llevarán la inicial a mayúscula y se numerarán con romanos.

- 6) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.
- 7) Se recomienda revisar los números recientes para familiarizarse con el estilo de la revista.

II. OTRAS COMUNICACIONES

- 1) El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo, comentarios o erratas de artículos publicados previamente, etcétera.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 3) El trabajo deberá enviarse igual que como se especifica en el inciso I-1.
- 4) Se aceptará un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto según el inciso I-4. En caso de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla, de acuerdo con las características que se indican en el inciso I-5.

Los manuscritos serán leídos por tres revisores en un lapso no mayor de dos meses. Las correcciones y sugerencias, así como las pruebas de página se enviarán al primer autor. En caso necesario se recurrirá a revisores externos al Comité Editorial.

El disco y las tres copias de los manuscritos se deberán enviar a la Revista de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal de la REB en su localidad.

