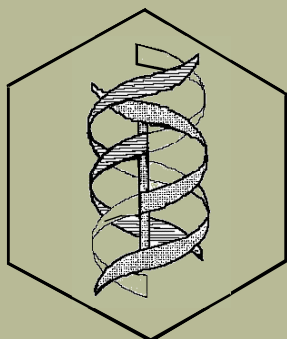


REB 2011

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



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

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNAM



Facultad de Medicina
UNAM



Sociedad Mexicana de
Bioquímica, A.C.

EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

VOL. 30

No. 2

JUNIO 2011

COMITÉ EDITORIAL

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

EDITORES

RAFAEL CAMACHO CARRANZA

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

ALICIA GAMBOA DE BUEN

Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN

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

GRACIELA MEZA RUIZ

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

LUIS ORTIZ HERNÁNDEZ

Departamento de Atención a la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA

Sección Bioquímica y Farmacología Humana
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

GUADALUPE REYES CRUZ

Departamento de Biología Celular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL

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

ASISTENTE EDITORIAL

MARIVEL ROJAS GARCÍA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES FUNDADORES

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

ENRIQUE PIÑA GARZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Coordinadora
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

JOSÉ CARLOS GARCÍA PIÑEIRO

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

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

SERGIO SÁNCHEZ-ARMÁSS ACUÑA

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

MARTHA ANGÉLICA QUINTANAR ESCORZA

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

MARÍA MALDONADO VEGA

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

AURELIO MENDOZA MEDELLÍN

Facultad de Medicina
Universidad Autónoma del Estado de México

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

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

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

CONTENIDO

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

DESDE HACE 30 AÑOS Yolanda Saldaña Balmori.....	43
--	----

ARTÍCULOS

TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS ASOCIADAS A LOS SISTEMAS DE SECRECIÓN EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS Elizabeth García-Gómez y Bertha González-Pedrajo	45
--	----

EL GLUTATION Y SU ASOCIACIÓN CON LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS, LA ESQUIZOFRENIA, EL ENVEJECIMIENTO Y LA ISQUEMIA CEREBRAL Jesús Martínez-Sámano, Patricia Victoria Torres-Durán, Marco Antonio Juárez-Oropeza.....	56
---	----

AVANCES EN LA IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS TERAPÉUTICOS Y EL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Itzhel García-Torres, Ruy Pérez-Montfort.....	68
---	----

OTRAS COMUNICACIONES

CRUCIBIOQ METABOLITOS SECUNDARIOS Alexander Gutiérrez y Yolanda Saldaña Balmori.....	82
---	----

CONVOCATORIA A TODOS LOS SOCIOS NUMERARIOS Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.....	85
---	----

II CONGRESO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE BACTERIAS Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.....	86
--	----

SMALL MEETING ON YEAST TRANSPORT AND ENERGETICS Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.....	87
--	----

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ METABOLITOS SECUNDARIOS Alexander Gutiérrez y Yolanda Saldaña Balmori.....	88
---	----

XVII REUNIÓN DE LA RAMA DE BIOENERGÉTICA Y BIOMEMBRANAS Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.....	89
--	----

XIV CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.....	90
--	----

CELL SIGNALING NETWORKS 2011 Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.....	91
--	----

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....	92
---	----

EDITORIAL

DESDE HACE 30 AÑOS

Para el primer número del Boletín de Educación Bioquímica (BEB) que apareció en marzo de 1982, los editores me pidieron un escrito en relación al Taller de Actualización Bioquímica del que yo era responsable. Dado que mi experiencia editorial se había iniciado 4 años antes al ser la editora principal del "Mensaje Bioquímico" que, desde 1978 reúne anualmente los contenidos de las pláticas o conferencias impartidas durante los Talleres de Actualización Bioquímica. El Dr. Enrique Piña, promotor y responsable de la edición del BEB me pidió, una vez que ya estuvo impreso el primer número, que lo revisara, y a partir de la cual, me integré al equipo de trabajo como Coordinadora Editorial, función que desempeñe desde junio de 1981 hasta diciembre de 1992, en 1993 el Dr. Jesús Manuel León Cázares asumió el cargo de Editor en Jefe, al que le sucedió en 1997 el Dr. José Víctor Calderón Salinas con el mismo cargo. Posteriormente y hasta la fecha he seguido participando en la Revista como Editor, lo que me ha permitido mantenerme al día en el campo de la ciencia, así como desarrollarme en el de la redacción.

Con mi primera inserción en el BEB inicié una serie llamada "El Rincón del Taller", en la que trimestralmente daba parte a la comunidad bioquímica el avance en la organización, programa, sitios en donde se habría de realizar el siguiente Taller de Actualización Bioquímica, además de los resultados de la evaluación del evento realizada por los asistentes; este material era muy útil pues con base en los resultados de las encuestas que los profesores contestaban durante la semana de trabajo, servían para planear contenidos, lugares, fechas, etc. para el siguiente Taller

En el BEB, que a partir de su Volumen 21 en 2002 cambió su nombre por Revista de Educación Bioquímica (REB), además del Comité Editorial actual, han participado diversos profesores e investigadores: Guillermo Álvarez Llera, Alfonso Cárabez Trejo, Guillermo Carvajal Sandoval,

Edmundo Chávez Cosío, Socorro Durán Vargas, Leonor Fernández Rivera-Río, Alberto Hamabata Nishimuta, J. Antonio Holguín Hueso, Alberto Huberman Wajzman, Carlos Larralde Rangel, J. Manuel León Cázares, Federico Martínez Montes, Jaime Mas Oliva, Fernando Montiel Aguirre Rafael Moreno Sánchez, Rosario Muñoz Clares, Enrique Piña Garza, Joel Reyes Méndez, Manuel Robert, Emilio Rojas del Castillo, Sergio Sánchez Esquivel, Saúl Villa Treviño y Alejandro Zentella Dehesa.

El trabajo de los editores fundadores fue muy significativo, pues con su participación se iniciaron algunas pautas que han marcado hasta ahora la ruta de la Revista; en este texto haré mención del trabajo de dos de los editores fundadores que en mi opinión marcaron, con su trabajo, esos primeros años de la Revista, uno es el Dr. Enrique Piña, que siendo Jefe del Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina de la UNAM, escuchó la petición de los profesores asistentes a los Talleres de Actualización Bioquímica -organizados por el mismo Departamento- que le solicitaron un órgano de comunicación entre los interesados en la docencia de la Bioquímica, lo que se concretó cuando convocó a profesores de diversas instituciones para iniciar el trabajo de edición del Boletín de Educación Bioquímica y el otro caso es el Dr. Guillermo Carvajal el que a lo largo de su participación como editor de 1982 a 1994 contribuyó con una colección de al menos de 46 comentarios, de uno o dos párrafos que nos acercaba a algunos de los artículos de más reciente publicación en las revistas científicas.

Los que hemos acompañado a la Revista, hemos sido testigos de logros y problemas, pero unos y otros nos han servido de estímulo o acicate para no desmayar y es así que a sus 30 años la REB es conocida y leída y de acuerdo con un proceso de evolución natural desde 2003 se lee en papel y en línea y a partir del 2010 sólo en línea.

Fue en 2003 cuando gracias al Dr. Jaime Mas Oliva, Director del Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), UNAM, se estableció el convenio para que la Revista pudiera estar en línea, lo que permitió que fuera accesible a un mayor número de lectores y así se tiene que de marzo de 2003 a marzo de 2011 se han registrado poco más de 31,000 aperturas de la Revista independientemente de si se consulta sólo un artículo o la Revista entera. Es importante mencionar que a partir de este archivo en línea la Revista se puede consultar en la página del Departamento de Bioquímica, en la de la Facultad de Medicina de la UNAM, en la Universidad de Ciudad Juárez y en la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC) que la tiene indexada en su base de datos desde 2007 y a la fecha reporta un promedio mensual de 2,463 visitas a sus artículos, y en total tiene contabilizadas un un total de 110,968 visitas hasta finales de mayo de 2011.

Con el trabajo conjunto de autores, revisores invitados, editores e instituciones que nos han apoyado constantemente, como es el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, la propia Facultad de Medicina, UNAM y la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A. C. de la cual el BEB y la REB han sido su órgano de comunica-

ción que sumado con el apoyo temporal que otras instituciones y dependencias universitarias nos han brindado (CONACYT, Coordinación de Investigación Científica de la UNAM; Sistema de Universidad Abierta, UNAM; Secretaría General de Rectoría, UNAM, PUIS, UNAM y la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.) se ha logrado una Revista que por 30 años ininterrumpidos ha servido más allá de nuestras fronteras para comunicarle a estudiantes, profesores, investigadores y al público interesado el contenido de los proyectos desarrollados por investigadores del área y presentados como artículos de revisión, además de que antes en el BEB, antes y ahora en REB se comunican eventos relevantes, se publican convocatorias a congresos, talleres y seminarios, se han comentado libros de reciente publicación, así como la publicación regular desde hace 12 años de crucigramas y su solución, aunado a que ha habido una sección en la que se han planteado problemas bioquímicos y sus respuestas. De este modo, con la Revista de Educación Bioquímica se pretende contribuir a la difusión de una ciencia que es pilar para el desarrollo de otras.

Dra. Yolanda Saldaña Balmori
Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina, UNAM

TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS ASOCIADAS A LOS SISTEMAS DE SECRECIÓN EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS*

Elizabeth García-Gómez y Bertha González-Pedrajo

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México. Ap. Postal 70-243. Ciudad Universitaria, México D. F. 04510
Tel. (55) 56-22-59-65. egarcia@ifc.unam.mx, bpedrajo@ifc.unam.mx

RESUMEN

Las bacterias Gram negativas utilizan distintos sistemas de secreción de proteínas para numerosos aspectos de su ciclo de vida. El ensamblaje de estos sistemas de secreción se lleva a cabo a través de las membranas interna y externa, así como el espacio periplásmico y la pared celular o capa de peptidoglicano. Para atravesar la pared celular, dichos sistemas requieren de la actividad de enzimas especializadas, denominadas transglicosilasas líticas (TLs) de transporte. Se han identificado TLs asociadas con diversos sistemas de secreción y se ha propuesto que estas enzimas son capaces de hacer huecos en el peptidoglicano de una forma espacial y temporalmente controlada, permitiendo así la inserción de complejos multiproteicos en la envoltura celular.

PALABRAS

CLAVE:

Bacterias Gram negativas, transglicosilasa lítica, peptidoglicano, sistemas de secreción

ABSTRACT

Gram-negative bacteria use diverse protein secretion systems for numerous aspects of their life cycle. During the assembly process these systems need to span the inner and outer membranes, the periplasmic space and the cell wall or peptidoglycan meshwork. In order to traverse the cell wall, secretion systems require specialized enzymes named transport lytic transglycosylases (LTs). LTs have been identified associated to several secretion systems and are proposed to make gaps in the peptidoglycan layer in a temporally and spatially controlled fashion, allowing the insertion of multiprotein complexes in the cell envelope.

KEY WORDS:

Gram negative bacteria, lytic transglycosylase, peptidoglycan, secretion systems

INTRODUCCIÓN

La secreción de proteínas es un proceso que participa en numerosos aspectos del ciclo de vida bacteriano, incluyendo la biogénesis de organelos, como el pilus y el flagelo, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia. En las bacterias Gram negativas la exportación de proteínas a la superficie bacteriana o al exterior celular involucra el transporte a través de la membrana interna (MI), el periplasma (en donde se localiza la pared celular) y la membrana externa (ME); tarea que desempeñan diferentes sistemas de secreción (1).

La pared celular es un biopolímero de carbohidratos y péptidos, esencial para mantener

la integridad bacteriana; sin embargo, también constituye una barrera física para el ensamblaje de los sistemas de secreción, ya que sólo permite el transporte de proteínas pequeñas (menores a 50 kDa). Debido a esto, se ha propuesto que existen enzimas especializadas que facilitan la apertura controlada de la pared celular. Estas enzimas asociadas a los sistemas de secreción se han denominado transglicosilasas líticas (TLs) de transporte para distinguirlas de aquellas que participan en los procesos de crecimiento y división celular. Las TLs necesitan actuar en el espacio y tiempo adecuados, lo cual se logra a través de su acoplamiento con el complejo de secreción correspondiente. En este sentido, se ha encontrado que existe una relación entre los reacomodos del peptidoglicano durante

la biogénesis de los sistemas de transporte y la identificación de TLs asociadas a éstos (2).

PARED CELULAR

En las bacterias Gram negativas, la pared celular (también denominada capa de peptidoglicano o capa de mureína) está embebida en el espacio periplásmico ubicado entre la MI o membrana citoplásmica y la ME. La pared celular envuelve completamente a la membrana citoplásmica, determinando la forma celular y protegiendo a la bacteria del estrés mecánico y osmótico (3).

El peptidoglicano está formado por unidades repetidas del disacárido de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidas por enlaces glicosídicos β -1,4 (Fig. 1A), dando lugar a cadenas que en promedio cuentan con 30 disacáridos. A las cadenas de disacáridos se unen covalentemente péptidos cortos, por medio del grupo lactilo del ácido N-acetilmurámico. La composición común de los péptidos en *Escherichia coli* es L-Ala/D-Glu/ácido meso-diaminopimélico (*m*-A₂pm)/D-Ala/D-Ala. Los péptidos a su vez se entrecruzan uniendo a las cadenas de disacáridos para formar la estructura de red o esponja característica del peptidoglicano. En *E. coli*, el residuo *m*-A₂pm, un aminoácido dibásico y dicarboxílico (intermediario de la vía de biosíntesis de lisina), permite la formación del enlace

peptídico entrecruzado. Este entrecruzamiento se produce entre el grupo carboxilo de un residuo de D-Ala (en el extremo carboxilo terminal de un péptido), y el grupo amino ϵ del *m*-A₂pm de un segundo péptido (3) (Fig. 1B). Las reacciones de entrecruzamiento son catalizadas por el dominio de transpeptidasa de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) (4).

En *E. coli* la capa de peptidoglicano tiene un grosor de 2.5 nm en el 75%-80% de su superficie, mientras que en el 20-25% presenta hasta 7 nm de ancho. Entre algunas de las propiedades de la pared celular está su gran resistencia a la presión osmótica, lo que le permite expandirse hasta tres veces sin sufrir ruptura. Por otro lado, se ha calculado que el diámetro de los huecos en el peptidoglicano es de 2.06 nm, y que por lo tanto sólo proteínas de 20-24 kDa pueden penetrar esta capa, sin embargo se ha determinado que proteínas globulares de hasta 50 kDa pueden atravesar el peptidoglicano cuando éste está expandido (4). En cuanto a la orientación de las cadenas de disacáridos respecto a la célula bacteriana existen dos modelos; en el primero se postula que las cadenas están orientadas paralelamente a la superficie celular y en el segundo, se propone que las cadenas están orientadas perpendicularmente (modelo del andamio). Sin embargo, existe un mayor número de evidencias que favorecen el primer modelo, y

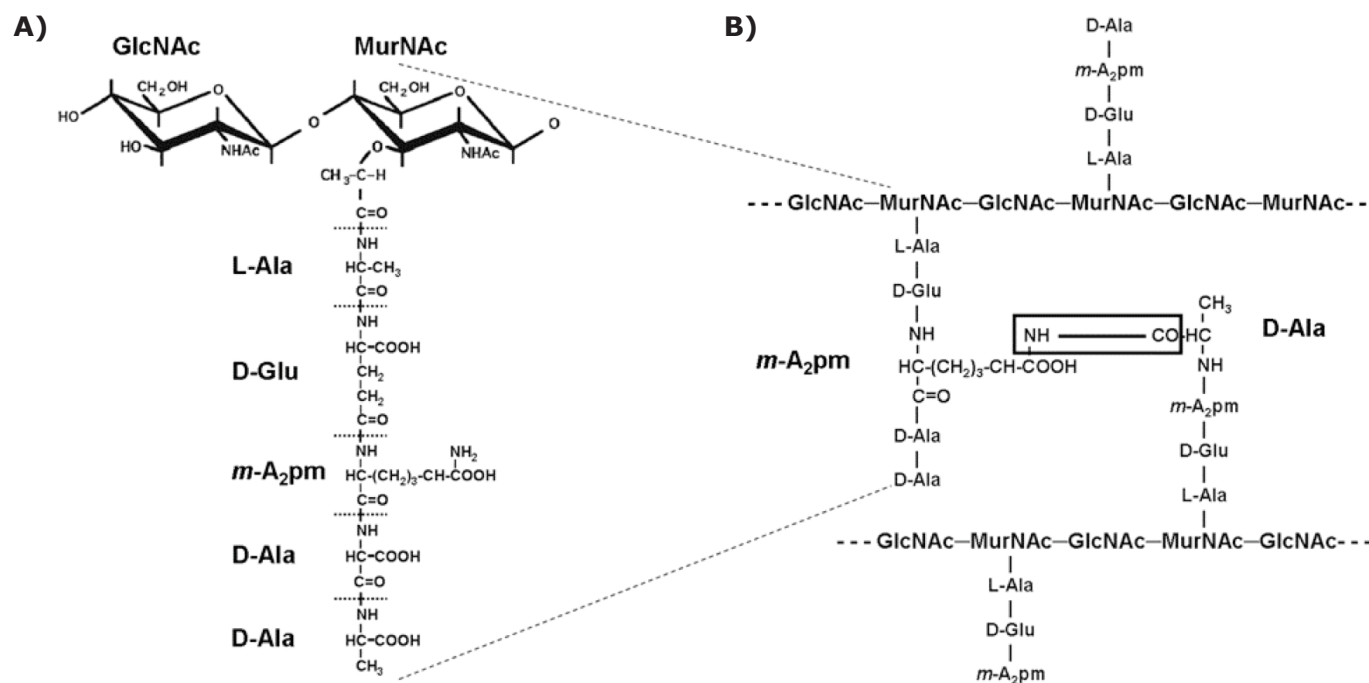
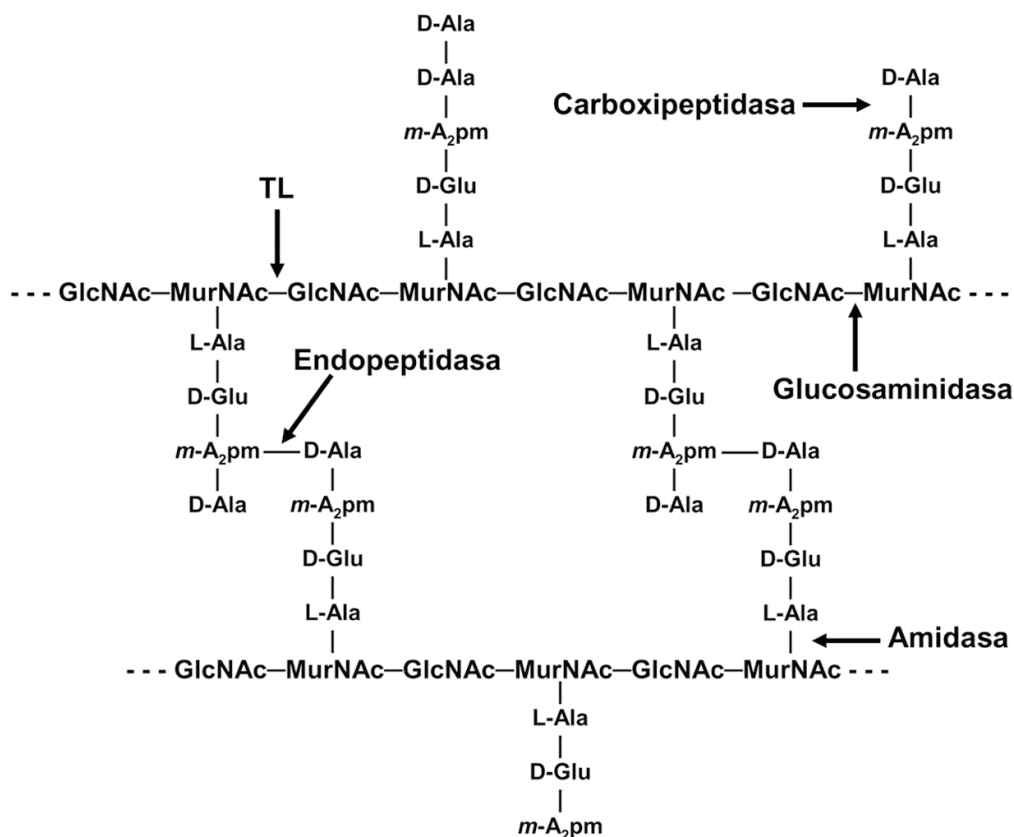


Figura 1. Peptidoglicano en *E. coli*. A) Composición química del peptidoglicano. Se indican los residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc), así como la composición de los péptidos asociados al MurNAc. B) Formación del entrecruzamiento entre los péptidos de dos cadenas de disacáridos. El entrecruzamiento se señala con un recuadro. Modificada de (3).

Figura 2. Enzimas líticas involucradas en el metabolismo del peptidoglicano. Se señalan con flechas los sitios de corte de cada tipo de enzima en la molécula de peptidoglicano. MurNAc: ácido N-acetilmurámico, GlcNAc: N-acetilglucosamina. Modificada de (5).



por otro lado, las cadenas de disacáridos son demasiado largas para acomodarse verticalmente, de acuerdo con el grosor que se ha determinado para la pared celular (4).

ENZIMAS LÍTICAS EN EL METABOLISMO DEL PEPTIDOGLICANO

A pesar de constituir una barrera, la capa de peptidoglicano no es una estructura rígida ni estática, ya que forma una red elástica capaz de expandirse y que está en continuo crecimiento, recambio y reciclaje; además, puede presentar variaciones en su composición en respuesta a las condiciones del medio ambiente. Durante el crecimiento y la división celular, la capa de mureína necesita alargarse y separarse para permitir la formación de dos células hijas, por lo que para que ocurran estos procesos se requieren enzimas que sintetizan y degradan el peptidoglicano de una forma coordinada para evitar la lisis de la bacteria (3, 4).

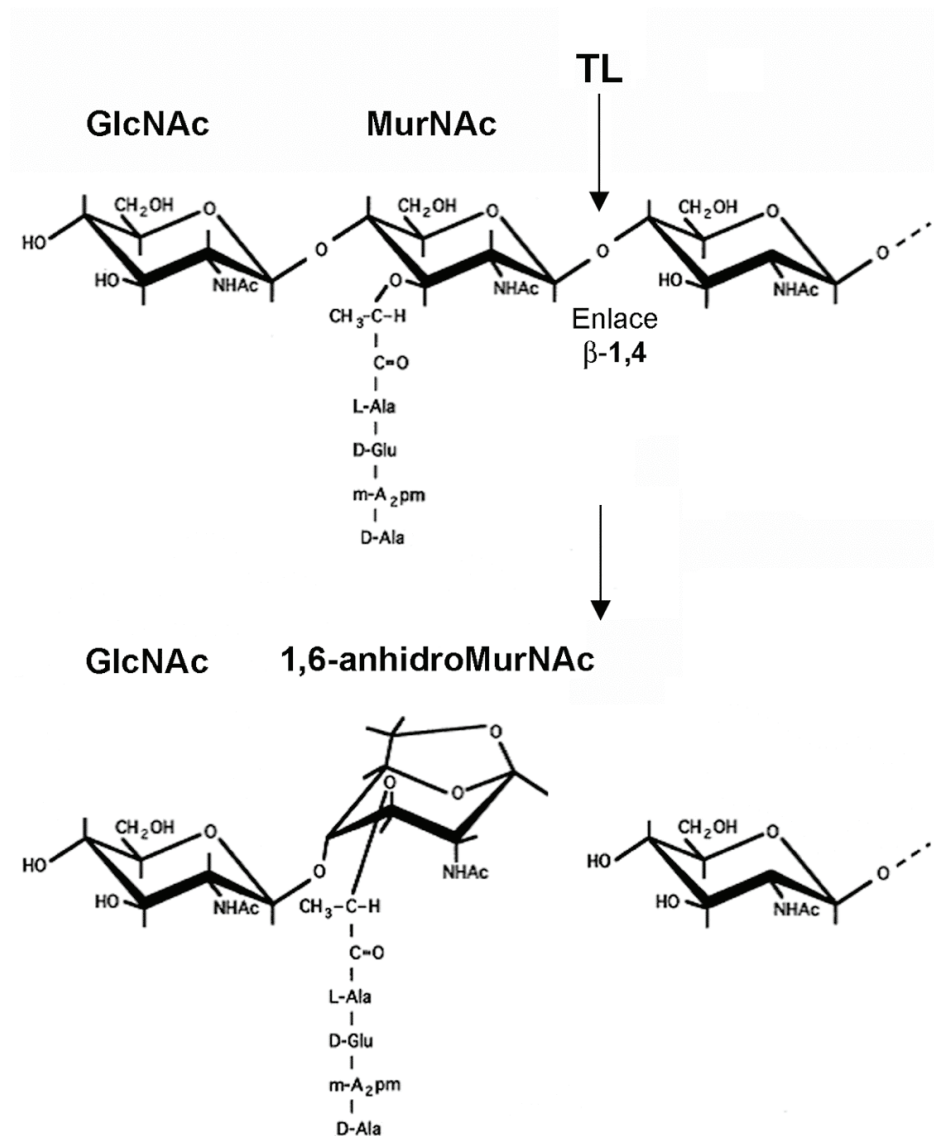
Las enzimas que degradan el peptidoglicano participan en una gran variedad de procesos fisiológicos. Además de su papel en el recambio del peptidoglicano durante el crecimiento celular y la separación de las células hijas en la división celular, participan en procesos de autólisis, esporulación, germinación de esporas, formación de biopelículas y

patogénesis (5, 6). Entre estas enzimas se encuentran endopeptidasas (que hidrolizan los entrecruzamientos peptídicos), carboxipeptidasas (cortan los enlaces peptídicos a partir del extremo C-terminal del péptido), glucosaminidasas (hidrolizan el enlace glicosídico entre la N-acetilglucosamina y el N-acetilmurámico), amidasas (hidrolizan el enlace amida entre el ácido N-acetilmurámico y L-Ala) y TLs (cortan el enlace glicosídico entre el N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina); es decir, existe una enzima para romper cada enlace covalente presente en el peptidoglicano (5, 7) (Fig. 2).

TRANGLUCOSILASAS LÍTICAS (TLs)

Las TLs son enzimas que, como la lisozima, degradan el peptidoglicano rompiendo el enlace glicosídico β, 1-4 entre los residuos N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Sin embargo, a diferencia de la lisozima, las TLs rompen el sustrato sin hidrolizarlo en una reacción en la que se forma un anillo intramolecular entre el carbono 1 y el carbono 6 del ácido N-acetilmurámico, para dar lugar a un residuo 1,6 anhidromurámico (7) (Fig. 3). De esta forma, en *E. coli* y otras bacterias Gram negativas los extremos de las cadenas de disacáridos poseen residuos de 1,6-anhidromurámico, originados por la actividad de las TLs (3).

Figura 3. Sitio de corte de las TLs en la molécula de peptidoglicano (enlace β , 1-4, señalado con una flecha) y formación del residuo 1,6 anhidromurámico (1,6 anhidro-MurNAc).
MurNAc: ácido N-acetilmurámico,
GlcNAc: N-acetilglucosamina Modificada de (7).



El mecanismo de reacción propuesto para las TLs está basado en análisis mutacionales, estructurales y bioquímicos, que incluyen el uso de inhibidores como bulgecina A, hexa-N-acetilquitohexosa y N-acetilglucosamin-tiazolina (NAG-tiazolina); los que han demostrado que un residuo de glutamato altamente conservado desempeña un papel central. Inicialmente el residuo glutamato catalítico actúa como un ácido, donando un protón al oxígeno del enlace glicosídico entre los residuos N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. En el proceso de ruptura de dicho enlace, se forma un intermediario oxocarbanión que se estabiliza por medio del grupo N-acetilo del residuo murámico. Posteriormente, el residuo catalítico desprotonado actúa ahora como base, abstrayendo un protón del hidroxilo del carbono 6 del N-acetilmurámico, promoviéndose un ataque nucleofílico intramolecular al carbono 1, que colapsa el producto intermediario y resulta

en la formación del residuo 1,6-anhidromurámico (6).

Por otra parte, las TLs se han agrupado en cuatro familias de acuerdo a la comparación de sus secuencias. La familia 1 representa a las TLs solubles (Familia Slt: *soluble lytic transglycosylases*), que presentan tres motivos consenso altamente conservados y que incluyen al glutamato catalítico (ES-GLMQ-AYNAG). Las familias 2 y 3 agrupan a las TLs asociadas a membrana (Mlt: *membrane-bound transglycosylases*) y la familia 4 está integrada principalmente por enzimas de bacteriófagos (8). Se ha determinado la estructura tridimensional de algunas TLs, por ejemplo Slt70 y Slt35 de *E. coli* (familia 1), MltA de *E. coli* y de *Neisseria gonorrhoeae* (familia 2), MltB de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (familia 3) y la TL del fago lambda (familia 4) (6); y se observa que presentan un plegamiento similar al de la lisozima GEWL.

SISTEMAS DE SECRECIÓN EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

En general, los sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas pueden dividirse en dos grupos principales: Sec-dependientes y Sec-independientes (Fig. 4). En los sistemas Sec-dependientes, las proteínas utilizan a la translocasa Sec para atravesar la MI, la cual reconoce una secuencia señal hidrofóbica o péptido líder en el extremo amino de la proteína a secretarse (de aproximadamente 30 aminoácidos). Una vez en el espacio periplásmico, el péptido líder es procesado por peptidasas periplásmicas asociadas a la MI, liberándose la proteína madura para su posterior transporte a través de la ME. Dentro de las vías Sec-dependientes se incluyen los sistemas de secreción tipo II (SST2) y los autotransportadores o sistema tipo V (SST5) (9).

El SST2 es un sistema ampliamente conservado en bacterias Gram negativas, tanto en patógenos de plantas (*Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia* spp., *Xanthomonas* spp.) como de animales (*Aeromonas hydrophila*) y de humanos (*Klebsiella oxytoca*, *P. aeruginosa*, *Legionella pneumophila*). Este sistema está formado por una estructura tipo pilus en el periplasma que secreta toxinas y enzimas hidrolíticas, como celulastas, elastasas amilasas, proteasas, fosfatasas, nucleasas, lipasas, etc. (9).

El SST5 o autotransportador, es un sistema presente en una gran variedad de bacterias Gram negativas y es utilizado principalmente para la secreción de proteínas de virulencia, como enzimas extracelulares y toxinas (*Neisseria* spp., *Bordetella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Yersinia* spp., *Moraxella catharralis*). Las proteínas transportadas por este sistema son capaces de insertar su región carboxilo en la ME formando un poro, a través

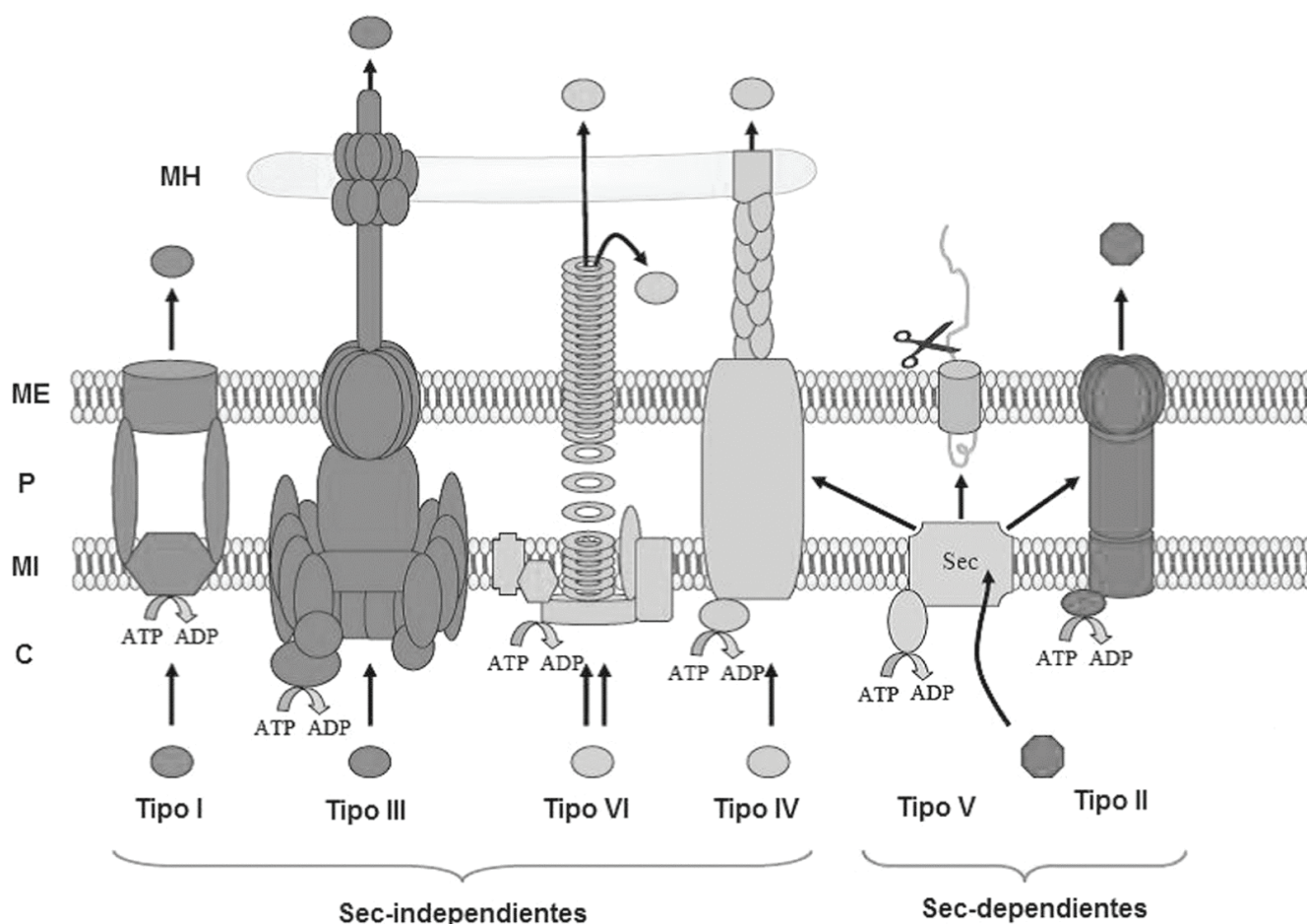


Figura 4. Representación de los sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas. Se muestran los sistemas clasificados como Sec-independientes (Tipo I, III, VI y IV) y Sec-dependientes (Tipo V y II). La secreción de la toxina pertussis a través del sistema tipo IV ocurre de forma Sec-dependiente. MH: membrana de la célula hospedera, ME: membrana externa bacteriana, P: periplasma, MI: membrana interna o citoplásmica. C: citoplasma. Tomada de (9).

del cual puede secretarse el dominio pasajero o funcional de la proteína, el que puede a su vez permanecer en la superficie bacteriana, o liberarse al medio a través de un procesamiento adicional (9).

Por otro lado, en las vías Sec-independientes las proteínas a secretarse no presentan un péptido líder en el amino terminal y se transportan desde el citoplasma hasta el medio extracelular en un solo paso, sin que existan intermediarios periplásmicos (Fig. 4). En éstas se incluye a los sistemas de secreción tipo I (SST1), tipo III (SST3, de virulencia y flagelar), el SST4 en algunas especies bacterianas y el sistema de secreción tipo VI (SST6) (9).

El SST1, también conocido como transportador ABC (*ATP-binding cassette*) se utiliza para la secreción de diferentes tipos de moléculas al medio extracelular, desde iones hasta toxinas, proteasas, hemóforos, lipasas, β -glicanos y polisacáridos. Se encuentra por ejemplo en *E. coli*, *Pasteurella haemolytica*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *E. chrysanthemi* y *Serratia marcescens* (9).

El SST3 se utiliza para el ensamblaje de dos estructuras: el flagelo (organelo responsable de la movilidad) y el denominado inyectisoma que se encarga de secretar proteínas efectoras de virulencia. El inyectisoma es un complejo macromolecular de secreción que está compuesto por más de 25 proteínas diferentes. Entre éstas, existen 8 proteínas que están altamente conservadas entre los diferentes SST3 y que comparten similitud con los componentes del aparato de exportación flagelar. El inyectisoma se encuentra tanto en patógenos de animales y plantas como en algunas bacterias simbiotes (*E. coli* enteropatógena [EPEC por sus siglas en inglés], *P. aeruginosa*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Xanthomonas* spp., *Erwinia* spp., *Rhizobium* spp., entre otras) y se utiliza para la translocación de proteínas efectoras directamente al citoplasma del hospedero. Las proteínas translocadas interactúan con componentes de la célula hospedera alterando diferentes vías de señalización. Los genes que codifican los componentes estructurales del SST3 y las proteínas efectoras que se transportan a través de éste, están generalmente agrupados en islas de patogenicidad plasmídicas o cromosomales (10).

El SST4 está involucrado en la translocación de complejos nucleoprotéicos y ADN tumoral, tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas y en el dominio Archaea. Los sistemas de este tipo mejor estudiados son los de *Brucella suis*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Helicobacter pylori*. Esta vía está relacionada con los sistemas de conjugación que facilitan la transferencia de ADN entre especies, y se utiliza para la adquisición y secreción de ácidos

nucléicos, así como de complejos nucleoprotéicos, y para la translocación de proteínas efectoras durante procesos infecciosos. En el caso de *A. tumefaciens* el SST4 está integrado por componentes que forman un canal de translocación y una estructura extracelular denominada pilus, la cual participa en el contacto con el hospedero y en la translocación de los sustratos. Aunque la secreción de la mayoría los sustratos a través de este sistema ocurre en una forma Sec-independiente, la excepción es la toxina pertussis (*Bordetella pertussis*), cuyas subunidades utilizan la translocasa Sec para transportarse al periplasma, en donde se ensamblan como holotoxina para después secretarse al medio extracelular vía SST4 (11).

El SST6, recientemente descubierto, secreta proteínas que están involucradas en la interacción con células eucariontes, aunque se desconoce si participan en virulencia o en simbiosis; sin embargo a las proteínas efectoras se les atribuyen las capacidades de adhesión e invasión a la célula hospedera, así como la inducción de crecimiento y la sobrevivencia intracelular en macrófagos. Este sistema se ha encontrado por ejemplo en *L. pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Rhizobium leguminosarum*, *Salmonella enterica* y *P. aeruginosa* (9).

TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS ASOCIADAS A SISTEMAS DE SECRECIÓN

Las TLs especializadas de los sistemas de transporte son proteínas pequeñas, generalmente de 150 a 250 residuos, que son prescindibles para el crecimiento y la división celular, pero necesarias para el correcto ensamblaje de los sistemas de secreción macromoleculares. Su permanencia como parte de diferentes sistemas de secreción a lo largo de la evolución refuerza su importancia (2). En la siguiente sección se hace énfasis principalmente en las TLs especializadas acopladas tanto al SST3 (de virulencia y flagelar) como al SST4.

Transglucosilasas líticas asociadas al SST3 de virulencia

El ensamblaje del inyectisoma, cuyo diámetro es de aproximadamente 10 nm en su parte periplásmica, claramente requiere de una degradación localizada de la pared celular. Como ya se mencionó, esta lisis se lleva a cabo por TLs especializadas. De acuerdo con esto, las islas de patogenicidad que albergan a los genes del SST3 generalmente codifican una proteína que contiene el dominio de TL (2). Recientemente se determinó que la proteína IpgF codificada por el plásmido de virulencia pWR100 de *Shigella flexneri* presenta actividad de degra-

dación del peptidoglicano. Además se comprobó la importancia del glutamato catalítico para esta actividad, ya que una mutante en este aminoácido no presenta actividad enzimática. A su vez, se observó que la proteína IagB de la isla de patogenicidad SPI-1 de *S. enterica* presenta actividad lítica sobre peptidoglicano (12).

Otro ejemplo de una proteína con similitud a TLs asociada al SST3 es Hpa2 del fitopatógeno *X. oryzae*, que presenta actividad lítica *in vitro* sobre paredes celulares de distintas especies bacterianas. Una mutante en *hpa2* afecta la proliferación de la bacteria en el hospedero y reduce su patogenicidad, lo que sugiere que la proteína Hpa2 contribuye al ensamblaje del SST3 (13).

En *Pseudomonas syringae* se han identificado tres proteínas con dominio de TLs asociadas al SST3: HrpH, HopP1 y HopAJ1, de las cuales, las dos primeras son transportadas hacia el periplasma vía el SST3. La sobreproducción de HrpH en *E. coli* es capaz de inhibir el crecimiento, mientras que una mutante en el glutamato catalítico no tiene este efecto. Mutaciones simples o combinadas en los genes que codifican dichas proteínas provocan una reducción en la translocación de efectores y en la virulencia. Los resultados obtenidos indican que estas tres TLs contribuyen al funcionamiento del SST3 durante el proceso de infección, actuando de forma coordinada. Además de la actividad de TL, HrpH y HopP1 pueden tener funciones adicionales involucradas en patogénesis, ya que ambas son translocadas a las células vegetales y contienen dominios que son capaces de suprimir el sistema inmune del hospedero e inducir muerte celular (14).

En el SST3 de EPEC (cepa E2348/69 O127:H6), que es una bacteria asociada con diarrea infantil en países en vías de desarrollo (15), encontramos que el gen *etgA*, localizado dentro de la isla de patogenicidad LEE (locus de esfacelamiento enterocítico), codifica una proteína que presenta similitud con transglicosilasas líticas. En nuestro grupo de trabajo hicimos la caracterización bioquímica de EtgA, determinando que tiene actividad de muramidasa y que el glutamato catalítico es esencial para dicha actividad enzimática. A su vez, demostramos que EtgA se transporta al periplasma de EPEC de forma Sec-dependiente y que su sobreproducción provoca inhibición del crecimiento bacteriano y lisis celular dependiente de la actividad de TL. Mediante la generación de una mutante nula en *etgA*, determinamos que esta enzima es necesaria para que se lleve a cabo un ensamblaje eficiente del inyectisoma de EPEC, aunque no es indispensable para que ocurra dicho proceso. Lo anterior nos ha llevado a proponer un modelo de la participación de EtgA durante la biogénesis del SST3, en el que

EtgA se transporta al periplasma por medio de la translocasa Sec, se dirige al sitio de formación del sistema por medio de su interacción con proteínas periplásmicas del SST3 y genera un hueco en la capa de peptidoglicano que facilita el ensamblaje del inyectisoma (Fig. 5) (16).

Transglicosilasas líticas asociadas al SST3 flagelar

El flagelo bacteriano es un organelo utilizado para la propulsión celular que le permite a la bacteria moverse en su ambiente. Está formado por tres componentes principales: cuerpo basal, gancho y filamento. El cuerpo basal consiste de un anillo de MI, un anillo asociado con la capa de PG, un anillo de ME, un eje periplásmico y un aparato de exportación formado por proteínas integrales de MI y asociadas a ésta (17). El eje es la primera estructura en atravesar la capa de peptidoglicano y ya que ésta constituye una barrera, se ha propuesto que la ruptura de la pared celular es un prerequisite para la formación del eje (18).

Se ha demostrado que la muramidasa FlgJ juega un papel importante en la biosíntesis del sistema flagelar de *S. enterica*. Esta muramidasa se secreta a través del sistema tipo III de exportación flagelar y presenta su actividad enzimática en el extremo C-terminal. Este dominio es el responsable de formar un hueco en la capa de peptidoglicano, permitiendo de esta forma la penetración del eje a través del espacio periplásmico para que puedan posteriormente ensamblarse el gancho y el filamento en el espacio extracelular (18). Sin embargo, se ha observado que una mutante en *flgJ* es capaz de nadar después de tiempos de incubación prolongados, indicando que la actividad de muramidasa no es absolutamente requerida para la formación del flagelo. Se propone que esto pudiera deberse a que el eje flagelar es capaz de ensamblarse a través de los huecos que se forman normalmente durante la biogénesis y el recambio del peptidoglicano (19).

Otro ejemplo de muramidasa asociada al sistema flagelar es el de la muramidasa SltF de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*, que a diferencia de FlgJ de *S. enterica* se transporta al periplasma por la vía de la translocasa Sec, y se demostró que es capaz de generar un hueco en la capa de peptidoglicano para la subsecuente penetración de la estructura flagelar en formación (20).

En el caso de la bacteria acuática *Caulobacter crescentus* se ha demostrado que PleA, una enzima homóloga a TLs, se requiere para la biogénesis flagelar, ya que una mutante puntual en el sitio activo de la enzima no forma flagelo. Además, PleA está

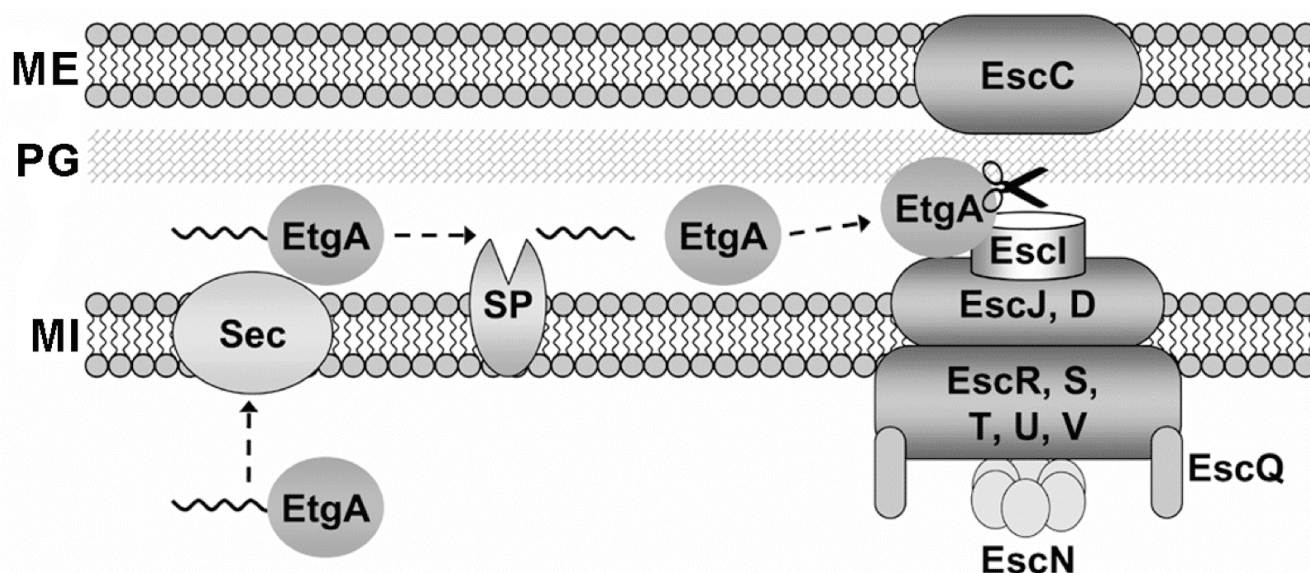


Figura 5. Modelo de la participación de EtgA en el ensamblaje del SST3 de virulencia de EPEC. EtgA se transporta al periplasma por la vía general de secreción (Sec), en donde se procesa su péptido líder (línea ondulada) por medio de peptidasas de la secuencia señal (SP) y se dirige hacia el SST3 en formación. Por medio de interacciones con componentes periplásmicos del SST3, EtgA degrada la capa de peptidoglicano de una forma localizada (evento representado con tijeras), permitiendo la formación de un hueco a través del cual puede ensamblarse el eje (EscI) para que continúe la biosíntesis del resto del sistema. Se indican algunas de las proteínas que conforman el cuerpo basal del injectisoma. ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna (16).

presente en la bacteria sólo durante un periodo de tiempo corto, que coincide con el ensamblaje flagelar, lo que indica su participación durante la formación del flagelo en una forma temporalmente controlada (21).

Transglicosilasas líticas en el SST4

El SST4 es utilizado por el patógeno de plantas *A. tumefaciens* para el transporte de complejos de nucleoproteínas que contienen ADN tumoral (T-ADN) (11). El operón *virB* en el plásmido Ti de este microorganismo codifica la proteína VirB1, la que se ha identificado como una TL relacionada con la capacidad de formación de tumores (22). VirB1 es una proteína con dos dominios: el de transglicosilasa lítica (TL) en el extremo amino y el dominio VirB1* en la región carboxilo, y ambos participan en la biogénesis del SST4 y en la virulencia (11). La actividad muralítica de la proteína VirB1 se ha demostrado tanto para la proteína de *A. tumefaciens* como para la del patógeno de animales *B. suis* (12) y se propone que facilita el ensamblaje del SST4, lisando en una forma localizada la pared celular para permitir su inserción. A su vez, el dominio VirB1* promueve dicho ensamblaje a través de interacciones proteína-proteína con algunos de los componentes periplásmicos del aparato secretor y con las subunidades del pilus T (23).

Por otro lado, en el SST4 de *N. gonorrhoeae* que secreta ADN para la transformación natural de gonococos, se identificó a la proteína AtIA como TL, y se determinó que la actividad de esta enzima es importante para la secreción de ADN, ya que se requiere para el ensamblaje del aparato secretor realizando una apertura controlada del peptidoglicano (24).

Otro ejemplo de TL relacionada con el SST4 es el de *H. pylori*, sistema para el que se ha demostrado la liberación de muropéptidos. Estos muropéptidos son translocados hacia células epiteliales a través del SST4, donde inducen la activación de la respuesta inmune vía la estimulación del receptor NOD1, contribuyendo de esta forma a la patogénesis. Los muropéptidos son generados por la actividad de la TL Slt (HP0645) sobre la pared celular durante el crecimiento bacteriano. Una mutante en *slt* presenta una reducción en la liberación de muropéptidos y en la activación de la respuesta inmune con respecto a la cepa silvestre (25).

Hipótesis que explican el fenotipo parcial de mutantes en transglicosilasas líticas

A pesar de la importancia biológica de las TLs, se han encontrado evidencias que sugieren que no son totalmente esenciales para los procesos en que participan. Por ejemplo, en mutantes de *E.*

coli carentes de algunas TLs no se afecta significativamente el proceso de crecimiento o división celular. Incluso, en una mutante de *E. coli* a la que se le eliminaron 6 TLs, sólo se afectó el proceso de separación celular, ya que se formaban cadenas cortas de bacterias unidas entre sí (26).

Adicionalmente, se ha observado que los sistemas de secreción pueden ensamblarse sin la asistencia de su correspondiente TL especializada, por lo que se ha propuesto que pudieran existir proteínas redundantes que sustituyan su función. Para el SST4, por ejemplo, se ha descrito que VirB1 no es completamente esencial para la transferencia del T-ADN, ya que la delección del gen *virB1* resulta sólo en una atenuación de la virulencia y de la formación de tumores, lo que podría indicar que existen otras enzimas que cumplen su función. Esto se ha sugerido también para la TL IagB del SST3 de *S. enterica*, ya que se reportó que una mutante en *iagB* no tiene ningún efecto sobre la secreción de proteínas ni sobre la formación del complejo aguja. Algo similar sucede con una mutante en *ipgF*, en la que no se encontró un efecto sobre la patogenicidad de *S. flexneri*. Asimismo, en el caso de la TL codificada por el gen *bfpH*, presente en el plásmido EAF de EPEC, se observó que una mutante nula *bfpH* no afecta la biogénesis del pilus tipo IV ni la adherencia, aunque se observó que dicha mutante presenta una reducción en su capacidad de autoagregación. Para este caso se propuso que la proteína EtgA de EPEC podría estar sustituyendo la función de BfpH (2).

En acuerdo con la hipótesis de redundancia funcional, se han reportado casos de complementación heteróloga entre TLs de distintos sistemas, como sucede con IpgF de *S. flexneri* y TrbN del SST4 del plásmido conjugativo RP4 que complementan una mutante en la TL P19 del plásmido conjugativo R1-16 (12). Algo similar sucede con LtgB de *N. gonorrhoeae*, que puede reemplazar funcionalmente a la TL del sistema de lisis del fago lambda (26), lo que sugiere que algunas TLs pueden funcionar para diferentes sistemas de secreción (2).

Una segunda hipótesis para explicar la carencia de fenotipos o los fenotipos débiles que presentan las mutantes en genes de TLs, sugiere que la actividad lítica de estas enzimas no es esencial para la biogénesis de los sistemas de secreción. En este sentido, se ha sugerido que los sistemas de secreción pudieran ensamblarse fortuitamente a través de los huecos que se forman naturalmente en la pared celular debido al continuo recambio que ocurre durante el metabolismo del PG. Esta hipótesis se ha sugerido para explicar el fenotipo de mutantes en *flgJ* (19) y *hrpH* (14). Adicionalmente, en nuestro grupo demostramos que la TL

BfpH, codificada en el plásmido de virulencia EAF de EPEC, a pesar de tener un alto porcentaje de similitud con EtgA y de expresarse en las mismas condiciones, no es capaz de sustituir su función (16). Estos datos contradicen la hipótesis de redundancia funcional, y apoyan la posibilidad de que los sistemas de secreción pueden llegar a ensamblarse sin la participación de las TLs, aunque la actividad de muramidasa de estas enzimas sí contribuye a la eficiencia de dicho proceso.

TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS COMO BLANCOS TERAPÉUTICOS PARA NUEVOS ANTIMICROBIANOS

Durante mucho tiempo el ser humano ha utilizado los antibióticos para tratar las enfermedades provocadas por bacterias patógenas, tanto en el ámbito clínico como en el agrícola. Sin embargo, el surgimiento de bacterias resistentes a múltiples antibióticos hace que estos fármacos sean cada vez menos efectivos, lo que constituye un riesgo importante para la salud pública. Otra desventaja de los antibióticos es que no sólo atacan y eliminan a la bacteria causante de la infección, sino a las bacterias de la microbiota normal, lo que provoca un desbalance que favorece el crecimiento de cepas patógenas. Lo anterior hace necesario el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos con modos de acción diferentes a los de los antibióticos tradicionales (27-29).

El conocimiento de los factores de virulencia y de la forma en que los patógenos manipulan los procesos celulares del hospedero se ha incrementado ampliamente en los últimos años, constituyendo una información que puede ser utilizada para la producción de compuestos antibacterianos. La inactivación de los sistemas de secreción involucrados en virulencia es una alternativa distinta a la de inducción de la muerte bacteriana, lo que a su vez conduciría a la atenuación específica del patógeno, sin afectar a la microbiota natural. Las proteínas conservadas entre los diferentes sistemas de secreción ofrecen diversos blancos para el diseño de fármacos antimicrobianos; algunas de estas proteínas al presentar actividad enzimática pueden ser objeto de inhibición química. Esta inhibición no tendría un impacto en las funciones vitales de la bacteria por lo que la presión de selección sería baja, y por consecuencia el desarrollo de resistencia sería un proceso lento. En este caso, de producirse resistencia a los agentes que bloquean la virulencia, posiblemente ésta conduciría a la formación de sistemas de secreción no funcionales y por lo tanto de bacterias no virulentas. (28-30).

Dado que las TLs especializadas tienen un mecanismo de reacción único entre las enzimas muralíticas, actúan sobre una estructura esencial en las bacterias como es la pared celular y no tienen equivalentes en el metabolismo humano, se han considerado como blancos potenciales para la producción de nuevos fármacos. Lo anterior se ve apoyado con el hallazgo de inhibidores específicos de algunas TLs. Uno de estos inhibidores, la NAG-tiazolina es un análogo del intermediario oxocarbanión que se forma durante la actividad de estas enzimas (6, 30). En consecuencia, la inhibición de las TLs especializadas podría bloquear o retrasar el ensamblaje de los sistemas de secreción a través de la envoltura celular, favoreciendo el "desarme" de las bacterias patógenas. A su vez, el uso de compuestos inhibidores podría aportar mayores beneficios si se combina con la aplicación de nuevos antibióticos (30).

CONCLUSIÓN

El ensamblaje de complejos macromoleculares como fimbrias, flagelos y sistemas de secreción

a través del periplasma requiere de la apertura localizada de huecos en la pared celular, tarea que es llevada a cabo por enzimas muralíticas especializadas o TLs que se han encontrado asociadas a dichos complejos. La presencia de genes que codifican TLs especializadas en plásmidos y en islas de patogenicidad relacionados con diversos sistemas de secreción, sugiere que son importantes para el ensamblaje y funcionamiento eficiente de estos sistemas de transporte. Aunque las evidencias experimentales sugieren que si bien la actividad de algunas TLs no es esencial para el ensamblaje de los sistemas de secreción, sí hace que dicho proceso sea mucho más eficiente, teniendo así un papel importante en la patogénesis bacteriana. Adicionalmente, su conservación a lo largo de la evolución puede ser el resultado de la adquisición de funciones adicionales que pueden ser importantes para la patogénesis. Lo anterior las hace candidatas ideales para blancos de nuevos antibacterianos, contribuyendo a la inactivación y eliminación del patógeno sin favorecer la aparición de cepas resistentes. 

REFERENCIAS

1. Thanassi DG, Hultgren SJ (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* 12: 420-30.
2. Koraimann G (2003) Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* 60: 2371-88.
3. Holtje JV (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 181-203.
4. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32: 149-67.
5. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 32: 259-86.
6. Scheurwater E, Reid CW, Clarke AJ (2008) Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 586-91.
7. Holtje JV (1995) From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 164: 243-54.
8. Blackburn NT, Clarke AJ (2001) Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J Mol Evol* 52: 78-84.
9. Beeckman DS, Vanrompay DC (2009) Bacterial Secretion Systems with an Emphasis on the Chlamydial Type III Secretion System. *Curr Issues Mol Biol* 12: 17-42.
10. Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433.
11. Wallden K, Rivera-Calzada A, Waksman G (2010) Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol* 12: 1203-12.
12. Zahrl D, Wagner M, Bischof K, Bayer M, Zavec B, Beranek A, Ruckenstein C, Zarfel GE, Koraimann G (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* 151: 3455-67.
13. Zhang J, Wang X, Zhang Y, Zhang G, Wang J (2008) A conserved Hpa2 protein has lytic activity against the bacterial cell wall in phytopathogenic *Xanthomonas oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 605-16.
14. Oh HS, Kvitko BH, Morello JE, Collmer A (2007) *Pseudomonas syringae* lytic transglycosylases coregulated with the type III secretion system contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. *J Bacteriol* 189: 8277-89.

15. Chen HD, Frankel G (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 29: 83-98.
16. Garcia-Gomez E, Espinosa N, de la Mora J, Dreyfus G, Gonzalez-Pedrajo B (2011) The muramidase EtgA from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion. *Microbiology* 157: 1145-1160.
17. Chevance FF, Hughes KT (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* 6: 455-65.
18. Nambu T, Minamino T, Macnab RM, Kutsukake K (1999) Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 181: 1555-61.
19. Hirano T, Minamino T, Macnab RM (2001) The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J Mol Biol* 312: 359-69.
20. de la Mora J, Ballado T, Gonzalez-Pedrajo B, Camarena L, Dreyfus G (2007) The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 189: 7998-8004.
21. Viollier PH, Shapiro L (2003) A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole. *Mol Microbiol* 49: 331-45.
22. Mushegian AR, Fullner KJ, Koonin EV, Nester EW (1996) A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7321-6.
23. Zupan J, Hackworth CA, Aguilar J, Ward D, Zambryski P (2007) VirB1* promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 189: 6551-63.
24. Kohler PL, Hamilton HL, Cloud-Hansen K, Dillard JP (2007) AtlA functions as a peptidoglycan lytic transglycosylase in the *Neisseria gonorrhoeae* type IV secretion system. *J Bacteriol* 189: 5421-8.
25. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 5: 1166-74.
26. Kohler PL, Cloud KA, Hackett KT, Beck ET, Dillard JP (2005) Characterization of the role of LtgB, a putative lytic transglycosylase in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology* 151: 3081-8.
27. Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan CQ (2007) Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol* 104: 1-13.
28. Baron C (2010) Antivirulence drugs to target bacterial secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 13: 100-5.
29. Keyser P, Elofsson M, Rosell S, Wolf-Watz H (2008) Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *J Intern Med* 264: 17-29.
30. Baron C, Coombes B (2007) Targeting bacterial secretion systems: benefits of disarmament in the microcosm. *Infect Disord Drug Targets* 7: 19-27.

EL GLUTATION Y SU ASOCIACIÓN CON LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS, LA ESQUIZOFRENIA, EL ENVEJECIMIENTO Y LA ISQUEMIA CEREBRAL*

Jesús Martínez-Sámano, Patricia Victoria Torres-Durán, Marco Antonio Juárez-Oropeza

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Escolar sin número, Ciudad Universitaria. México D.F. C.P. 04510. Correo E: rsamano13@gmail.com, pavitodu@yahoo.com.mx, majo_ya@yahoo.com.mx

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral se asocian, en diferentes estadios de su desarrollo, con la existencia de estrés oxidativo; los antioxidantes constituyen un eje de protección ante la producción de especies reactivas, éstas incluyen las de tipo enzimático y las no enzimáticas; el glutatión en su forma reducida es un tipo de defensa no enzimática, y es una de las primeras líneas de defensa ante el daño oxidante. Las funciones biológicas del glutatión involucran su participación como: antioxidante, neuromodulador, detoxificante, por lo que su deficiencia es importante en la fisiopatogenia de las enfermedades anteriormente mencionadas, ya que en diferentes etapas de su desarrollo se encuentra una disminución importante en los niveles cerebrales de este metabolito. El conocimiento del metabolismo del glutatión en el cerebro es necesario para comprender la progresión e incluso el desarrollo de las enfermedades asociadas a la neurodegeneración.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases, schizophrenia, aging and brain ischemia are associated, at different stages of development, with the existence of oxidative stress. Antioxidants constitute an axis of protection against the production of reactive species; these include both enzyme and non-enzyme defenses. Glutathione, in its reduced form, is a non-enzyme defense, and is one of the first lines of defense against oxidative damage. The biological functions of glutathione involve its participation as: antioxidant, neuromodulator, detoxifying, so its deficiency is important in the pathogenesis of the diseases mentioned above, as at different stages of their development is a significant decrease in brain levels of this metabolite. Knowledge of the glutathione metabolism in the brain is necessary to understand the progression and even the development of diseases associated with neurodegeneration.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo heterogéneo de padecimientos que representan más del 50% de las consultas en la especialidad de neurología; tienen gran repercusión en el ámbito económico, social y laboral. Además, provocan graves problemas e incluso la muerte en la mayoría de las personas

que las padecen (1). Entre las enfermedades neurodegenerativas encontramos la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. La esquizofrenia, una enfermedad psiquiátrica; la isquemia cerebral, un desorden neurológico agudo y el envejecimiento, un proceso fisiológico, tienen en común con las enfermedades neurodegenerativas el aumento de las especies reactivas de oxígeno

PALABRAS

CLAVE:

Estrés oxidante, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esquizofrenia, terapia antioxidante.

KEY WORDS:

Oxidative stress, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, schizophrenia, antioxidant therapy

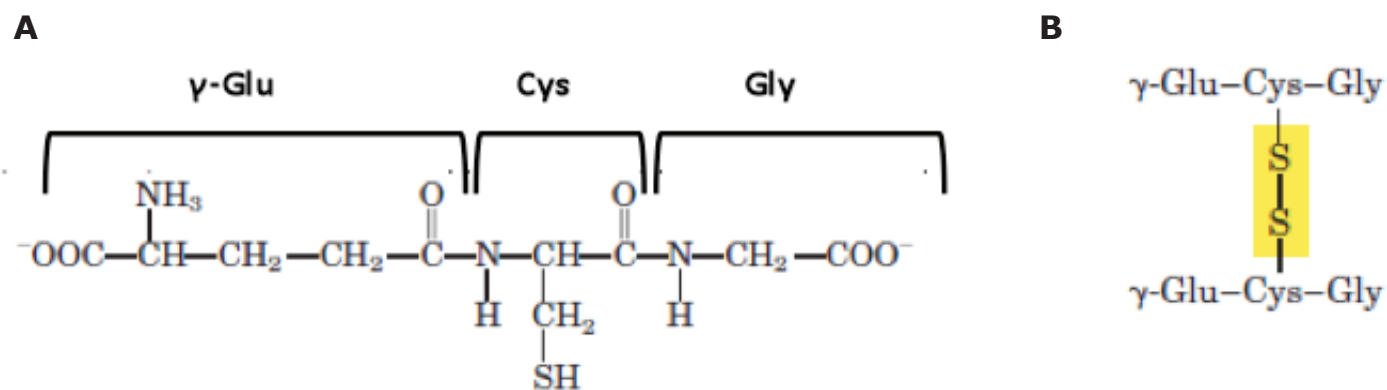


Figura 1. Representación de: A, glutatión reducido (GSH) y B, glutatión oxidado (GSSG). El GSH está constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. En el caso del GSSG son dos moléculas unidas por un puente disulfuro formado por las cisteínas.

y de nitrógeno (ERO y ERN, respectivamente), con un consecuente daño oxidante. El papel del glutatión en el desarrollo de estas enfermedades ha sido controvertido, pero la evidencia reciente ha mostrado que en etapas tempranas de estas enfermedades ocurren alteraciones en el metabolismo del glutatión.

ESTRÉS OXIDANTE (EO)

Los radicales libres son definidos como moléculas o fragmentos moleculares con uno o dos electrones desapareados. Un electrón desapareado incrementa la reactividad química de un átomo o molécula y busca complementar su último orbital; es por ello que los radicales libres tienen una vida media muy corta (millonésimas de segundos) y son altamente reactivos con otras moléculas (2). El estrés oxidativo se origina por un desequilibrio entre la producción de ERO y ERN y la capacidad antioxidante de la célula. Las ERO incluyen, entre otras, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), los radicales hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); y las ERN incluyen el óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), dióxido de nitrógeno ($NO_2^{\cdot}$) y el peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$), entre otras moléculas. El daño a los tejidos causado por estrés oxidativo se ha relacionado con diversos fenómenos biológicos, incluyendo envejecimiento, carcinogénesis, aterosclerosis, neurodegeneración etcétera (3).

Los antioxidantes son moléculas que cuando están presentes en concentraciones más bajas respecto a las de un sustrato oxidable, retrasan o inhiben la oxidación de este sustrato; entre ellos podemos mencionar los sistemas antioxidantes enzimáticos, que incluyen a la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y los sistemas no enzimáticos como

las vitaminas A, C y E, flavonoides, carotenoides y algunos metabolitos de bajo peso molecular como el glutatión en su forma reducida (GSH).

El estrés oxidativo puede dañar a lípidos, proteínas y los ácidos nucleicos, alterando las funciones de estas moléculas (4). El cerebro posee un elevado metabolismo oxidativo y un alto contenido de moléculas susceptibles de ser dañadas por especies reactivas, aunado a una baja capacidad antioxidante comparada con otros tejidos; por tanto, las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas producidas en cantidades abundantes en el cerebro, lo hacen más susceptible al daño oxidativo. El estrés oxidativo ha mostrado ser uno de los factores que predisponen para la neurodegeneración (3).

FUNCIONES Y METABOLISMO DEL GLUTATIÓN

Síntesis del glutatión

El tripéptido glutatión (GSH, γ-L-glutamyl-L-cisteinylglycine) (Fig. 1) es sintetizado en el citoplasma de las células por la acción consecutiva de dos enzimas: γ-glutamyl-cisteína (γ-GluCys) sintetasa (también conocida como glutamato cisteína ligasa, GCL por sus siglas en inglés) que utiliza glutamato y cisteína como sustrato para formar el dipéptido γ-glutamylcisteína, el cual es combinado con la glicina en una reacción catalizada por la glutatión sintetasa para formar GSH. El trifosfato de adenosina (ATP) es donador de energía para ambas enzimas. Las concentraciones intracelulares de glutatión son reguladas por la inhibición de la γ-GluCys sintetasa por el producto final, GSH. Así, existe un equilibrio celular entre la síntesis y el consumo de este metabolito (5).

Funciones del glutatión

El glutatión se encuentra en concentraciones promedio de 12 mM en células de mamíferos. Tiene importantes funciones como antioxidante, es parte importante de la detoxificación de xenobióticos, es cofactor para las reacciones de isomerización y también sirve como almacenamiento y transporte de cisteína (5). Además, es esencial para la proliferación celular y tiene un papel importante en la apoptosis, ya que la disminución de la cantidad de glutatión es permisiva para la activación de caspasas y la progresión de los mecanismos de apoptosis (6). Una función muy importante del glutatión es mantener el potencial de óxido-reducción de la célula, ya que mantiene en estado reducido los grupos tiol de las proteínas y así permite la generación de diversas cascadas de señalización intracelular; un ejemplo es la proteína cinasa C, que contiene varios residuos de tirosina en su centro catalítico, que le confieren sensibilidad al estado redox de la célula, lo que puede afectar la señalización mediada por esta enzima (7).

Metabolismo del glutatión

Durante la detoxificación de las ERO, el glutatión está involucrado en dos tipos de reacciones: la interacción no enzimática con radicales como el anión superóxido, óxido nítrico y radical hidroxilo; otra forma es proporcionando un electrón para la reducción de peróxidos en la reacción catalizada por la GPx. El producto final de la oxidación de GSH es glutatión oxidado (GSSG, constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro, Fig 1) que es regenerado por la glutatión reductasa (GR), esta enzima transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciendo esta molécula. Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR el glutatión no es consumido, pero es reciclado y así puede de nuevo ser utilizado cuando se requiera. Por otro lado, durante la generación de conjugados-S-glutatión por las glutatión-S-transferasas (GST) o por la liberación de GSH por las células, el nivel total de GSH disminuye dentro de las células. Por lo tanto, el glutatión utilizado para esos procesos tiene que ser remplazado por síntesis de novo. El GSH extracelular y los conjugados-S-glutatión son sustratos para la ectoenzima γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GT), esta enzima cataliza la transferencia del motivo γ -glutamilo del GSH (o de los conjugados-S-glutatión) a una molécula aceptora y por lo tanto, generando el dipéptido cisteinilglicina (o el conjugado-S-cisteinilglicina) y el γ -glutamilo-conjugado. El dipéptido cisteinilglicina puede ser hidrolizado por ectopeptidasas a cisteína y glicina,

aminoácidos que posteriormente pueden ser transportados por la célula a través de transportadores específicos y participar en la síntesis de novo de glutatión (Fig. 2) (8).

Presencia de GSH en cerebro

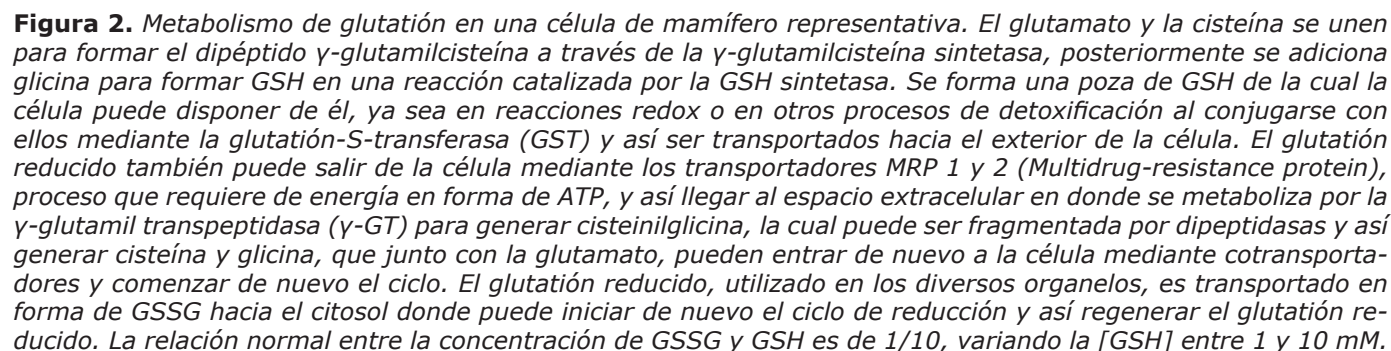
La síntesis de glutatión en cerebro sigue las mismas vías que en otros tejidos. Las enzimas que producen glutatión muestran una gran actividad en los plexos coroideos, aunque el glutatión es una molécula que se encuentra con homogeneidad en todo el cerebro (concentración de 1 a 3 mM), hay regiones en las cuales este metabolito se encuentra en mayores concentraciones y se ha documentado la presencia de las enzimas que son responsables de su síntesis en células gliales y en neuronas. La concentración de GSH en astrocitos en cultivo parecen ser mayor que en neuronas en cultivo; no obstante, cuando se co-incubaban ambos tipos celulares la concentración de GSH es mayor en las neuronas, indicando su interacción (Fig. 3) (8).

Transporte del GSH hacia el cerebro

La homeostasis del glutatión dentro del cerebro se mantiene predominantemente por el reciclamiento de sus constituyentes dentro del cerebro, pero en condiciones en las cuales incrementa la demanda, deben de obtenerse nuevos precursores a partir del plasma, estos deben de ser transportados a través de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual es altamente selectiva a diversas moléculas y la única forma por la que pasan es a través de transportadores específicos. Además del transporte de los precursores, se ha descrito el transporte del glutatión hacia el cerebro desde el plasma, por un transportador dependiente de sodio a través de los capilares cerebrales (9).

Metabolismo de glutatión en cerebro

Hay investigaciones que indican la presencia de actividad de las enzimas que metabolizan glutatión en cerebro (GR y GPx), aunque son menores que en otros tejidos como el riñón e hígado. Además, en cortes histológicos, se ha encontrado inmunoreactividad para GPx en células de microglia de cerebro de rata. También se han descrito neuronas inmunoreactivas para GPx en la lámina II de la corteza cerebral, el giro dentado y el núcleo pontino del ratón. En contraste, en cerebros humanos se ha encontrado una inmunoreactividad débil para GPx en astrocitos y neuronas, pero un incremento significativo se ha encontrado en los márgenes de áreas cerebrales infartadas en cerebros humanos (10).



reducido a través de su ciclo de reducción. Los procesos bioquímicos que consumen glutatión en reacciones no óxido-reductoras, también se han descrito en cerebro; por ejemplo, se han reportado gran variedad de isoenzimas de GST expresadas en cerebro, de las tres clases de GST (α , μ y π) la clase α es expresada en astrocitos, neuronas y células endoteliales; la clase μ en neuronas y astrocitos; la clase π en oligodendrocitos (8).

Las interacciones entre los astrocitos y las neuronas son de gran importancia para el metabolismo del GSH, ya que los precursores que llegan vía BHE

ingresan a los astrocitos, y en estos se lleva a cabo la síntesis de GSH, el cual se transporta hacia el espacio extracelular donde es metabolizado por la γ -GT, generando cisteinilglicina que puede ingresar a las neuronas para integrarse a la formación de nuevo GSH. El transporte de GSH, como tal, a través de transportadores específicos entre astrocitos y neuronas es un proceso poco estudiado y requiere mayor investigación (Fig. 3).

Funciones del glutatión en el cerebro

En la actualidad se ha hecho énfasis en las funciones especiales del glutatión en cerebro. Se

considera que funciona como una neurohormona (o neuromodulador), debido a que: 1) se ha detectado glutatión en el espacio extracelular, 2) su liberación se estimula en cortes cerebrales, 3) se une específicamente a receptores extracelulares que generan cascadas de señalización en astrocitos y 4) promueve la inducción de corrientes de sodio en la neocorteza (11).

El glutatión extracelular tiene funciones detoxificantes, por ejemplo en la isquemia cerebral experimental se metaboliza por medio de la γ -GT para generar compuestos menos tóxicos (Fig. 3), entre ellos encontramos el γ -glutamil glutamato que se forma por la combinación con glutamato, un

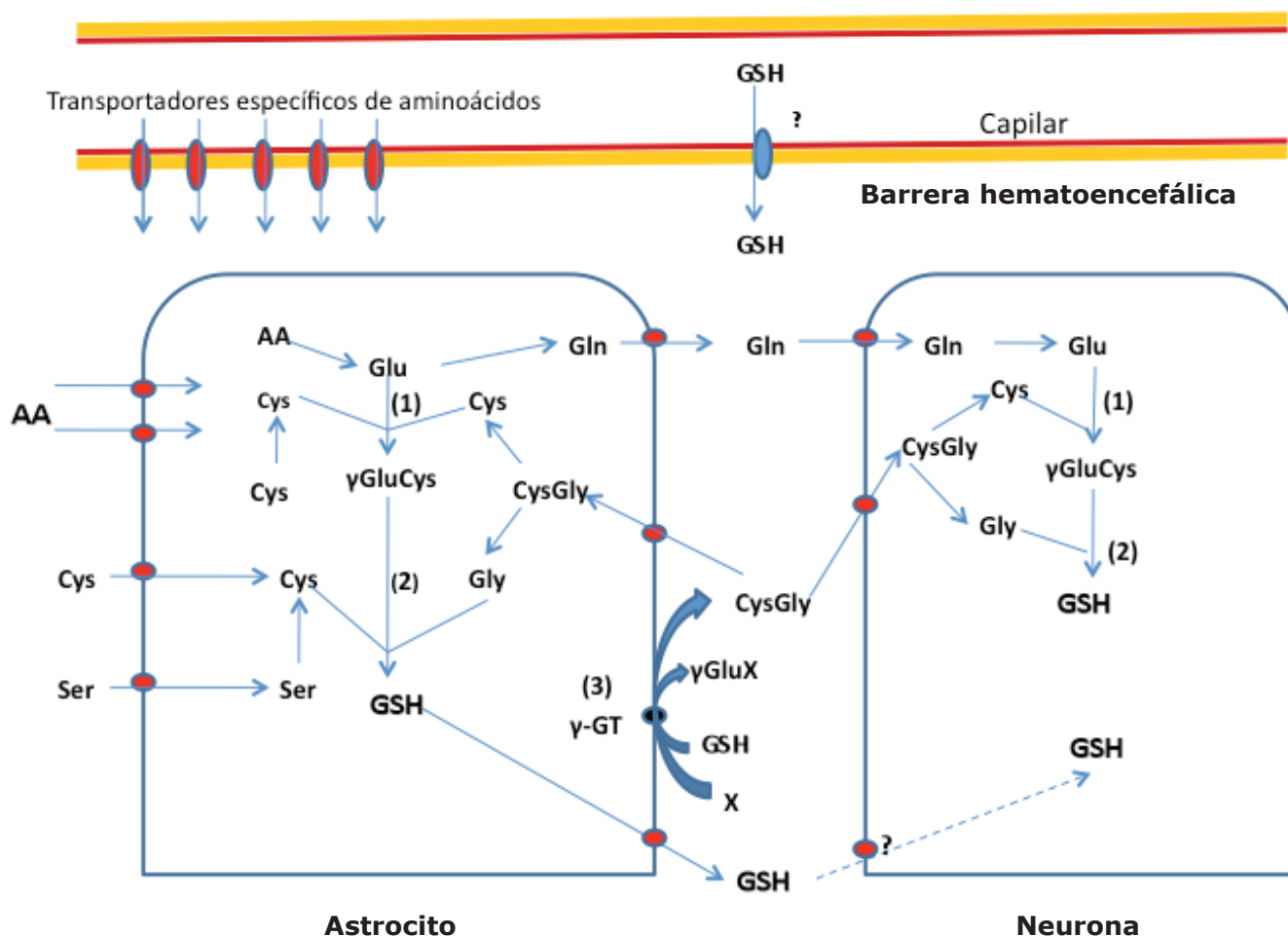


Figura 3. Metabolismo de glutatión en células del sistema nervioso central. Esquema propuesto para las interacciones metabólicas entre los astrocitos y las neuronas en el metabolismo del glutatión. Los astrocitos toman diferentes precursores que provienen del torrente sanguíneo e ingresan a través de la barrera hematoencefálica, y sintetizan GSH. El GSH liberado por los astrocitos al medio extracelular es sustrato de la γ -GT de membrana plasmática del astrocito; la cisteinilglicina generada en esta reacción sirve como sustrato para la síntesis de glutatión por la neurona. Además, la glutamina liberada por los astrocitos es usada por las neuronas para generar glutamato, necesario para la síntesis de glutatión. El transporte del glutatión desde la barrera hematoencefálica y desde el líquido cerebroespinal hacia las neuronas y su ingreso hacia las neuronas vía el transportador es un proceso poco conocido. (1) γ -glutamylcisteína sintetasa; (2) GSH sintetasa; (3) gamma glutamil transpeptidasa (γ -GT); GS-R, conjugado-S-glutatión; R-CysGly, conjugado-S-cisteinilglicina; X, sustrato aceptor de glutamato; γ Glu-X, sustrato glutamilo por ejemplo glutail-glutamato. (Figura adaptada de las referencias 8 y 14).

componente que en condiciones de isquemia se incrementa (el glutamato) y genera muerte neuronal por excitotoxicidad. Otro ejemplo de detoxificación por el GSH es el asociado a los metabolitos oxidados de las catecolaminas (*o*-quinonas), ya que se ha observado que la deficiencia en la actividad de la enzima GST se asocia a daño y menor sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas. Otra de las funciones del GSH es participar indirectamente con el metabolismo de los leucotrienos. Así, el leucotrieno C4 (LTC4, un conjugado S-glutatión) es producto de la transferencia del GSH al leucotrieno A4 (LTA4), mediante la enzima GST; el leucotrieno D4 (LTD4, un conjugado-S-cisteinilgluticina) es generado a partir del LTC4 en una reacción catalizada por la γ -GT. Ambos lípidos están relacionados con funciones neuroendocrinas y excitatorias (8).

Deficiencia de glutatión y neurodegeneración

El balance entre la producción de ERO y los mecanismos antioxidantes se encuentran alterados en el envejecimiento y en diversas enfermedades neurodegenerativas (3, 12), hay bastantes reportes de la literatura que relacionan el decremento o alteraciones en el metabolismo del glutatión con diversas enfermedades neurodegenerativas, entre las cuales se encuentran las siguientes:

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) está caracterizada por una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta* del mesencéfalo. La etiología de la enfermedad es todavía desconocida y se menciona una interacción de factores genéticos, ambientales y actualmente la inflamación subclínica como mecanismo principal. Se han sugerido varios procesos en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, entre los que se encuentran el estrés oxidativo, la inhibición del complejo I mitocondrial, la disfunción de los proteasomas, acumulación de la proteína α -sinucleína y la inflamación. Análisis bioquímicos de encéfalos postmortem han proporcionado evidencia de la generación de estrés oxidativo en la *sustancia nigra* durante el curso de la enfermedad, ya que el contenido de glutatión total en esta región se encuentra disminuido en 40-50% comparado con controles. Además, en esta región se han encontrado niveles incrementados de lipoperoxidación. El valor elevado de la relación GSSG/GSH (normalmente 1:10) es consistente con el concepto de estrés oxidativo como parte importante en la patogénesis de la EP. Por otro lado, las concentraciones bajas de GSH, parecen

ser el primer indicador de estrés oxidativo durante la progresión de la EP. Además de los niveles bajos de este metabolito, se ha observado que la enzima γ -GT está incrementada selectivamente en la *sustancia nigra*, este incremento podría reflejar el intento para conservar localmente la disponibilidad de los precursores del glutatión (cisteinilgluticina, Fig. 3) para prevenir una disminución en los niveles del glutatión de las neuronas dopaminérgicas. Aunque la disminución de GSH por sí sola no es la responsable de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, la disminución de GSH podría volver a las neuronas susceptibles a otros estímulos estresantes y contribuir al daño neuronal. Se ha descrito que el GSH protege del estrés nitrosativo al complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, ya que se forma el S-nitrosoglutatión. Cuando este complejo incrementa su contenido de grupos nitrotirosina y nitrosotiol, en respuesta al estrés nitrosativo, se inhibe su actividad y, en consecuencia la formación de ATP, lo que conduce a degeneración neuronal y la muerte de las neuronas dopaminérgicas (8, 13, 14).

También las células gliales contribuyen a la generación de ERO en la EP, la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas podría ser en parte debido a la actividad de las células gliales que rodean a estas neuronas, ya que estas células gliales también están implicadas directamente en los niveles de GSH. El compromiso del sistema del glutatión en células astrogiales podría contribuir a la disminución de defensas antioxidantes y por lo tanto incrementar la susceptibilidad de estas células y en consecuencia, una deficiente defensa glial podría contribuir al daño neuronal existente (15).

Enfermedad de Alzheimer (EA)

La enfermedad de Alzheimer está caracterizada por alteraciones en la función de la memoria y cognición progresiva, representa la forma más común de demencia en la vejez, su etiología se desconoce, pero se han relacionado factores genéticos como las mutaciones en los genes que codifican las proteínas presenilinas 1 y 2 y factores ambientales. Sea cualquiera de las causas, los estudios patológicos muestran una desaparición de las neuronas piramidales del hipocampo (el sustrato biológico de la memoria) y neuronas colinérgicas del prosencéfalo. En la EA se observan cúmulos de péptidos amiloides que pueden, por sí mismos, aumentar el calcio intracelular, la actividad de la NADPH oxidasa y en astrocitos aumentar la producción de ERO. La disminución en la producción de ATP, por disfunción del complejo IV de la cadena de transporte

de electrones mitocondrial, conduce a disfunción de los proteasomas y mayor cúmulo de péptidos amiloides (3). El estrés oxidativo es propuesto como el mecanismo fisiopatológico inicial para el desarrollo de EA, las concentraciones de GSH se encuentran disminuidas en pacientes con EA en las áreas de la sustancia innominada y la corteza del cíngulo. Además, las actividades específicas de algunas enzimas que metabolizan el glutatión se encuentran elevadas, tal es el caso de la GPx, la glutatión reductasa y la GST. Otros productos derivados del estrés oxidativo también se encuentran elevados, tal es el caso del 4-hidroxinonenal (4-HNE, un producto de la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados omega-6), neurotóxico para neuronas *in vitro*. La GST es la enzima detoxificante de este metabolito. Estos resultados muestran la evidencia de la participación del EO en la patogénesis de la EA (16, 17).

Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad caracterizada por la destrucción de las neuronas motoras en el tronco o tallo cerebral y del asta ventral de la médula espinal, además de las neuronas motoras de la corteza cerebral que forman el tracto corticoespinal que desciende a través de la médula espinal lateral, resultando clínicamente en debilidad, atrofia muscular, fasciculaciones y espasticidad.

Una de las principales características fisiopatológicas es la disfunción mitocondrial, con disminución en la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones (3). Además, en algunos pacientes se ha encontrado mutación en el gen de la enzima SOD. El anión superóxido, al ser una molécula altamente reactiva, se combina con óxido nítrico para formar peroxinitritos, tal como lo muestran las investigaciones que encuentran elevado este metabolito en corteza y médula espinal.

Pero aunque el EO tiene un papel fundamental en la ELA, la participación del glutatión aún sigue siendo incierta y quizá las alteraciones en el estado oxidativo en esta entidad nosológica sean el reflejo secundario del estrés oxidativo causado por la deficiencia de la superóxido dismutasa (18).

Además de las enfermedades neurodegenerativas mencionadas, también se ha observado alteraciones en el metabolismo del glutatión en enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, en desórdenes neurológicos agudos como la isquemia cerebral y en procesos fisiológicos como el envejecimiento, mismos que a continuación se describen.

Esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad crónica, que se desarrolla progresivamente. La etapa premórbida que se presenta durante la infancia o en la adolescencia, frecuentemente pasa inadvertida, pero conduce a un estado de psicosis desde el inicio de la edad adulta. Por lo anterior, se ha considerado a la esquizofrenia como un síndrome del neurodesarrollo, que involucra alteraciones en la estructura, conectividad y sincronización neuronal, derivadas de múltiples factores genéticos y ambientales (19).

Aunque son múltiples los factores que pueden conducir a la esquizofrenia, se ha propuesto como uno de sus ejes fisiopatológicos a la disregulación redox. En la esquizofrenia se ha encontrado disminución en los sistemas de defensa antioxidante y aumento en la peroxidación de lípidos, tanto en tejidos periféricos de los pacientes como en estudios post mortem de sus cerebros (20). Hasta el momento, no es claro si esta disregulación redox es debida a un exceso en la producción de ERO, a una disminución en los mecanismos antioxidantes o a ambos. No obstante, se ha propuesto que el defecto genético en la síntesis del glutatión puede ser el evento inicial de la falla en las defensas antioxidantes, en contraste con las enfermedades neurodegenerativas, en donde la disminución del glutatión está acompañada del estrés oxidativo por disfunción de los complejos I y IV mitocondriales o por la toxicidad de los péptidos amiloides (19).

En la esquizofrenia se ha encontrado una disminución significativa en los niveles de glutatión en el líquido cerebroespinal de pacientes que presentan este padecimiento y que no han consumido antipsicóticos (27% de disminución) (21). Aunado a este hallazgo, estudios con espectroscopia de resonancia magnética del protón han mostrado que existe una disminución del 50% en la concentración de glutatión en la corteza frontal de pacientes con esquizofrenia, comparado con pacientes controles (22).

Se han demostrado varios polimorfismos en los genes que codifican para las enzimas del metabolismo del glutatión. La enzima reguladora de la síntesis de glutatión, la GluCys sintetasa (o GCL), está constituida por dos subunidades, una moduladora (GCLM) y la otra catalítica (GCLC). Los polimorfismos de este gen se han asociado con la esquizofrenia, y se han clasificado en genotipos de bajo riesgo y de alto riesgo. Los genotipos de alto riesgo están presentes en 35-40% de los pacientes. El cultivo de fibroblastos de estos pacientes mostró menor actividad de GLC y menor concentración de GSH. También se ha observado polimorfismo en los genes de las isoenzimas de la GST (GSTM1,

GSTT1, GSTP1 y GSTA1), encontrándose que la combinación de ellos tiene mayor riesgo para la presentación de la esquizofrenia (19, 23).

La exposición al estrés oxidativo en diferentes estados del neurodesarrollo afecta al menos dos procesos que son disfuncionales en la esquizofrenia: La hipofunción de los receptores NMDA glutamatérgicos y una mielinización deficiente.

Los receptores NMDA son sensibles al ambiente redox, su actividad se disminuye en condiciones de estrés oxidativo. La deficiencia de GSH conduce a una respuesta disminuída de estos receptores; por el contrario, su funcionamiento adecuado incluye la estimulación del sistema tiorredoxina-perirredoxina, lo que explica que la hipofunción de estos receptores contribuya al estrés oxidativo. La dopamina disminuye la respuesta de los receptores NMDA cuando el GSH está disminuído, pero en concentración normal de GSH la dopamina estimula los receptores NMDA (19).

La mielinización mediada por los oligodendrocitos es sensible al estrés oxidativo, ya que en condiciones de incremento de ERO disminuye su proliferación celular y la mielinización. El defecto en la mielinización puede afectar la velocidad de conducción axonal y alterar los procesos de sincronización durante el desarrollo. La mielinización cortical está presente durante la adolescencia tardía en las regiones prefrontal y temporal, lo que podría explicar que el período clínico de la esquizofrenia se manifiesta en la etapa adulta. Durante el desarrollo de niños y adolescentes de alto riesgo para desarrollar esquizofrenia se ha observado que la mielinización es menor en comparación con sujetos control de edades similares (19).

Eventos vasculares cerebrales (EVC)

Los EVC constituyen una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en México y a nivel mundial (1), con numerosas secuelas a largo plazo. El EVC tipo isquémico representa aproximadamente del 80-85% de todos los casos; hay suficiente evidencia que sostiene la participación del estrés oxidativo como mecanismo fundamental del daño cerebral por reperusión. Cuando ocurre un EVC tipo isquémico, hay reducción en el flujo sanguíneo cerebral, generando un área central y un área de penumbra, en la zona central existe muerte neuronal casi después de iniciado el evento, mientras que en la zona de penumbra permanecen neuronas en bajo estado metabólico o no funcionales. Después del evento isquémico, se acumula ácido láctico y se desarrolla acidosis tisular, promoviendo el estado prooxidante en el área. Diversos antioxidantes participan en esta etapa del proceso (CAT, SOD,

vitaminas), uno de ellos, el GSH, ha mostrado ser una de las primeras líneas de defensa, ya que sus niveles disminuyen después del evento isquémico. Por el contrario, la disminución en la concentración del GSH, en diversos modelos animales, antes del evento isquémico, tiene como consecuencia un mayor daño, comparado con controles en los cuales no se disminuyó la concentración del GSH antes del evento (24, 25).

Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso fisiológico, gradual, que se asocia a la disminución de la capacidad de adaptación en cada uno de los órganos, aparatos y sistemas, así como de la capacidad de respuesta a los agentes lesivos que inciden en el individuo, comprometiendo su estructura, función, integridad, homeostasia, haciéndolo más vulnerable, lo que conduce a la muerte. De manera general, se ha propuesto que el envejecimiento ocurre, asociado a la edad, como un conjunto de interacciones de origen intrínseco (genético), extrínseco (ambiental) y estocástico (daño aleatorio a moléculas vitales) (26).

Gran número de trabajos apoyan la idea que la exposición repetida o prolongada a los glucocorticoides (GC) tiene efectos deletéreos en la función cerebral y han dado evidencia de que los GC contribuyen al declinamiento de la función cerebral relacionada al envejecimiento. Los efectos mediados por el estrés y los GC, en el envejecimiento, son evidentes a nivel del comportamiento, respuestas electrofisiológicas y en estudios anatómicos. La actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HHS) mediada por GC, está alterada en el envejecimiento. Independientemente de la causa subyacente en la actividad del eje HHS, se ha demostrado que el estrés y los GC tienen efectos profundos en el aprendizaje, la memoria y la plasticidad neuronal. Además, tanto el estrés y los GC contribuyen a la atrofia neuronal, cambios en la tasa de recambio de neuronas y a la muerte neuronal. Otros estudios han demostrado que las intervenciones diseñadas para reducir la actividad del eje HHS pueden reducir los signos del envejecimiento del cerebro (26).

El GSH se ha asociado con la longevidad, durante el envejecimiento las concentraciones de glutatión plasmático disminuyen, lo cual podría indicar que la disminución de éste podría predisponer para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas propias de este grupo etario (14). Por otro lado, la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática en las membranas sinápticas disminuye progresivamente con el incremento de la edad. Esta enzima es muy

sensible al estrés oxidativo y sufre importantes cambios estructurales y funcionales cuando se expone a un ambiente oxidante. Los principales cambios que se han observado son la inactivación rápida, cambios conformacionales, agregación, internalización y degradación proteolítica. La proteólisis es mediada por calpains y caspasas (27). La disminución en la actividad de esta enzima también se ha observado en la isquemia cerebral y en enfermedades neurodegenerativas. Por otra parte, en el envejecimiento se observa una mayor cantidad de glicosilfosfolípidos de cadena larga, tanto en fibroblastos, en cerebros y en riñones, lo que podría ser utilizado como un marcador de senescencia. En contraste, la acumulación de glicosilfosfolípidos de cadena larga se atenúa durante la restricción calórica, procedimiento que aumenta la longevidad (28).

Entendiendo la manera en la que el estrés y el GSH, así como las alteraciones del eje HHS, exacerbaban el envejecimiento cerebral, podremos diseñar esquemas preventivos y terapéuticos para personas ancianas cuyas funciones cerebrales están (o en riesgo de estar) notablemente deterioradas durante la senescencia.

Terapéutica antioxidante contra las enfermedades neurodegenerativas

Los antioxidantes han mostrado características notables que facilitan su uso en la práctica diaria; así, acciones como el consumo de una dieta rica en polifenoles, xantofilas, carotenoides y alimentos ricos en grupos sulfhidrilo, todos ellos encontrados en frutas, vegetales, nueces, ajo, *Spirulina*, entre otros, tendría beneficios en la salud y protección ante enfermedades en las cuales el estrés oxidativo se relaciona con el desarrollo y progresión de la enfermedad (29).

Atenuar la disminución de los niveles de glutatión podría tener efectos benéficos en los pacientes con diversos desórdenes neurodegenerativos. Se han realizado numerosos intentos por disminuir la progresión de las enfermedades neurodegenerativas, uno de ellos es el empleo de diversos antioxidantes para disminuir el avance de estas entidades, como el empleo de la N-acetilcisteína (30), la vitamina C o de la vitamina E, en pacientes con enfermedad de Parkinson. Este tipo de tratamiento con moléculas

antioxidantes, ha mostrado la elevación progresiva de las concentraciones de glutatión en pacientes con diagnóstico previo. Además, se han desarrollado análogos de glutatión para el tratamiento de estas enfermedades, por ejemplo la administración de monoetiléster de GSH en cobayos incrementa los niveles de GSH en un modelo de deficiencia de vitamina C; otro ejemplo es el análogo YM 737 que protege contra la isquemia experimental en rata. Las ventajas de estos componentes, a diferencia del GSH, es que tienen mayor facilidad para cruzar la barrera hematoencefálica y ser transformados rápidamente en glutatión en su forma reducida en el tejido neural; sin embargo, estos fármacos aún no están disponibles para el uso en humanos (8, 31).

Diferentes estudios han mostrado que la terapia antioxidante puede retrasar o disminuir los síntomas relacionados con las enfermedades neurodegenerativas por ejemplo, efectos benéficos cognitivos en pacientes con EA y disminución de algunos síntomas en pacientes con EP. Pero ya que los síntomas se presentan después de iniciado el proceso fisiopatológico, existe duda si la terapéutica preventiva con antioxidantes tendría efectos benéficos o positivos sobre la salud humana (32); sin embargo, sería un punto de recomendación que en sujetos con alta probabilidad de desarrollo de enfermedad de tipo neurodegenerativa, del neurodesarrollo o del envejecimiento, se determinen niveles séricos de GSH o en fluido cerebroespinal e iniciar un tratamiento temprano para retrasar las complicaciones causadas por la presencia de estrés oxidativo (33, 34).

En conclusión, es evidente la asociación del estrés oxidativo con los procesos neurodegenerativos; debido a sus características antioxidantes, el glutatión representaría una de las primeras líneas de defensa en contra del estrés oxidativo y aunque su papel no sea tan evidente en algunos padecimientos, es importante señalar que este metabolito es utilizado por diferentes enzimas que detoxifican y que su restitución podría mejorar o retrasar el daño ocasionado por el agente fuente de estrés oxidativo (Fig. 4).

Agradecimientos. Se agradece el apoyo parcial de los proyectos PAPIIME PE204810, PAPIIT IN205410, UNAM. 

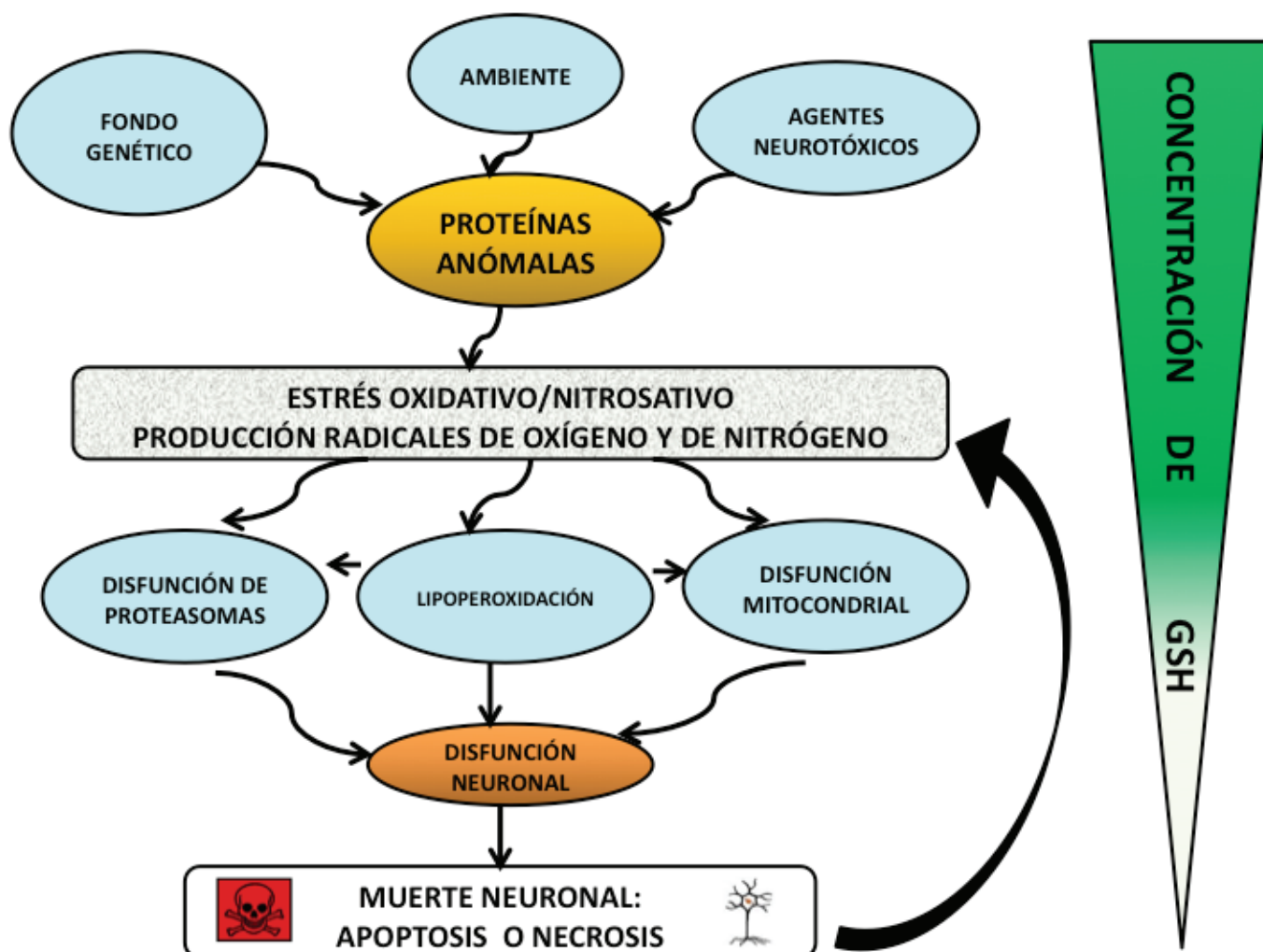


Figura 4. Relación del glutatión con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. Se muestra que a medida que ocurren los eventos fisiopatológicos que desencadenan la disfunción neuronal, disminuye gradualmente la concentración de glutatión, y en consecuencia sus funciones biológicas (antioxidante, neuromodulador, detoxificante, etc.). La interacción de factores ambientales, genéticos y tóxicos, lleva a la generación de proteínas con conformaciones anómalas, lo que conduce a la generación de estrés oxidativo y nitrosativo. La generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno tiene como consecuencias: la propagación de la lipoperoxidación, la disfunción mitocondrial, la disfunción de los proteasomas y, la disfunción neuronal y glial, lo que culmina en la muerte neural, por necrosis o apoptosis.

REFERENCIAS

1. Sistema Nacional de Información en Salud. Estadísticas 2000-2008. www.sinais.salud.gob.mx, accesado el día 11 abril 2011.
2. Castrejón Sosa M (2007) Radicales libres y sistemas antioxidantes. En: Bioquímica: un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida. Editores: Diaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA. McGraw-Hill Interamericana, México. pp 611-628.
3. Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radicals in biology and medicine. Fourth Edition. Oxford University Press, New York, USA, p. 851.
5. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390:191-214.
6. Franco R, Cidlowski JA (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16:1303-1314.
7. McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL (2005) Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu Rev Nutr* 25: 261-295.
8. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain, metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267: 4912-4916.
9. Aoyama K, Watabe M, Nakaki T (2008) Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci* 108: 227-238.
10. Takizawa S, Matsushima K, Shinohara Y, Oga-wa S, Komatsu N, Utsonomiya H, Watanabe K (1994) Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in infarcted human brain. *J Neurol Sci* 122:66-73.
11. Janaky R, Ogita K, Pasqualotto BA, Bains JS, Oja SS, Yoneda Y, Shaw CA (1999) Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem* 73: 889-902.
12. Farooqui T, Farooqui AA. (2011) Lipid-Mediated Oxidative Stress and Inflammation in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* doi:10.4061/2011/247467.
13. Martin HL, Teismann P (2009) Glutathione: a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J* 23:3263-3272.
14. Bain JS, Shaw CA (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev* 25:335-358.
15. Heales SJ, Lam AA, Duncan AJ, Land JM (2004) Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res* 29:513-519.
16. Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM (2004) Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann N Y Acad Sci* 1019:346-349.
17. Ghosh N, Ghosh R, Mandal SC (2011) Antioxidant protection: A promising therapeutic intervention in neurodegenerative disease. *Free Radic Res* DOI: 10.3109/10715762.2011.574290.
18. Bento-Abreu A, Van Damme P, Van Den Bosch L, Robberecht W (2010) The neurobiology of the amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 31:2247-2265.
19. Do QM, Cabungcal JH, Frank A, Steullet P, Cuenod M (2009) Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 19: 220-230.
20. Gawryluk JW, Wang JF, Andreazza AC, Shao L, Young LT (2011) Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 14: 123-130.
21. Raffa M, Mechri A, Othman LB, Fendri C, Gaha L, Kerkeni A (2009) Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 1178-1183.
22. Micó JA, Rojas-Corrales MO, Gibert-Rahola J, Parellada M, Moreno D, Fraguas D, Graell M, Gil J, Irazusta J, Castro-Fornieles J, Soutullo C, Arango C, Otero S, Navarro A, Baeza I, Martínez-Cengotitabengo M, González-Pinto A (2011) Reduced antioxidant defense in early onset first-episode psychosis: a case-control study. *BMC Psychiatry* 11:26.
23. Gravina P, Spoletini I, Masini S, Valentini A, Vanni D, Paladini E, Bossù P, Caltagirone C, Federici G, Spalletta G, Bernardini S (2011) Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1, GSTP1 and GSTA1 as risk factors for schizophrenia. *Psychiatry Res* 187:454-456.
24. Allen CL, Bayraktutan U (2009) Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 4: 461-470.
25. Mizui T, Kinouchi H, Chan P (1992) Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats. *Am J Physiol* 262: 313-317.

26. Riddle DR (2007) Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms. Frontiers in Neuroscience. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
27. Strehler EE (2010) Plasma membrane Ca²⁺-ATPases: Targets of oxidative stress in brain aging and neurodegeneration. World J Biol Chem 26:271-280.
28. Hernández-Corbacho MJ, Jenkins RW, Clarke CJ, Hannun YA, Obeid LM, Snider AJ, Siskind LJ (2011) Accumulation of Long-Chain Glycosphingolipids during aging is prevented by caloric restriction. PLoS One 6:e20411.
29. Friedman M (1994) Improvement in the safety by foods by SH-containing amino acids and peptides. J Agric Food Chem 42: 3-20.
30. Deana OM, van den Buuse M, Berka M, Copolova DL, Mavrosa C, Bush AI (2011) N-acetyl cysteine restores brain glutathione loss in combined 2-cyclohexene-1-one and d-amphetamine-treated rats: Relevance to schizophrenia and bipolar disorder. Neurosci Lett doi:10.1016/j.neulet.2011.05.027.
31. Brambilla D, Mancuso C, Scuderi MR, Bosco P, Cantarella G, Lempereur L, Benedetto G, Pezzino S, Bernardini R (2008) The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. Nutr J 30:7-29.
32. Halliwell B (2011) Free radicals and antioxidants – quo vadis? Trends Pharmacol Sci 32:125-130.
33. Lee HP, Zhu X, Casadesus G, Castellani RJ, Nunomura A, Smith MA, Lee HG, Perry G (2010) Antioxidant approaches for the treatment of Alzheimer disease. Expert Rev Neurother 10:1201-1208.
34. Surendran S, Rajasankar S (2010) Parkinson's disease: oxidative stress and therapeutic approaches. Neurol Sci 31:531-540.

AVANCES EN LA IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS TERAPÉUTICOS Y EL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS*

Itzhel García-Torres, Ruy Pérez-Montfort

Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Instituto de Fisiología Celular.
Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior S/N. Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510.
México D.F. Correo E: garcia.itzhel@gmail.com, ruy@ifc.unam.mx

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, es considerada una de las enfermedades tropicales más olvidadas que afecta a más de 10 millones de personas alrededor del mundo. A más de 100 años de su descubrimiento, no se ha encontrado un fármaco que sea eficaz contra esta enfermedad en cualquiera de sus dos principales etapas. Se han realizado numerosos estudios alrededor del mundo enfocados en la selección de blancos potenciales para el desarrollo de fármacos contra la enfermedad de Chagas. En este trabajo realizamos una revisión acerca de estos estudios, haciendo énfasis en aquéllos basados en las diferencias presentadas en el metabolismo de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de esta enfermedad, con respecto al de su hospedero mamífero. Mediante el análisis detallado de estas diferencias metabólicas, se han revelado un importante número de blancos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos. De manera prometedora, el diseño racional de fármacos con base en el conocimiento de estas moléculas, ha permitido que algunos de estos nuevos compuestos, se encuentren en las primeras fases preclínicas.

ABSTRACT

Chagas disease affects over 10 million people around the world, and it is considered one of the most neglected tropical diseases. Even though this disease was discovered more than 100 years ago, there is not an effective drug against Chagas in any of its two main stages. There are several studies around the world focused on the selection of potential targets for drug development against Chagas disease. In this work, we made a revision of these attempts with emphasis in those works based on the metabolic differences between *Trypanosoma cruzi* (the etiological agent of chagas disease) and its mammalian host. As a result of the detailed analysis of these metabolic differences, a great number of potential targets for rational drug design have been revealed, and some of the most promising molecules designed are now being tested in early preclinical studies.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es considerada por la Organización Mundial de la Salud como parte de las 13 enfermedades tropicales más olvidadas, entre las que también se encuentran la enfermedad del sueño y varios tipos de leishmaniasis. Esta enfermedad representa un problema tanto de salud como económico principalmente para varios

países de Latinoamérica. La enfermedad de Chagas también llamada tripanosomiasis americana es causada por el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*, que fue descubierto por el médico brasileño Carlos Chagas en 1909. A pesar de que han transcurrido un poco más de 100 años después del descubrimiento de la enfermedad, se han recuperado DNA de *T. cruzi* de momias humanas en estudios paleontológicos que demuestran que

PALABRAS CLAVE:

Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, blanco terapéutico, diseño racional de fármacos

KEY WORDS:

Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, therapeutic target, rational drug design

este parásito afecta al humano desde hace aproximadamente 9,000 años (1). Por otro lado, a pesar de que el primer reporte de la enfermedad la hizo el Dr. Chagas, existen indicios que sugieren que Carlos Darwin pudo haber contraído la enfermedad en la expedición que hizo a Sudamérica en 1835, ya que hace una descripción muy importante de la chinche besucona (vector del parásito), además de que hay evidencia que demuestra que presentó síntomas característicos de la enfermedad (2)

De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud actualizados en el 2010 (www.who.int) se estima que alrededor de 10 millones de personas se encuentran infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Latinoamérica es la región endémica de la enfermedad de Chagas en donde se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad más de 25 millones de personas; se estima que, en el 2008, se presentaron más de 10,000 muertes debido a esta parasitosis. Esta enfermedad está asociada en forma importante con condiciones de vivienda de pobreza extrema. Los principales países afectados tienen altos índices de pobreza, y entre ellos se incluye México. La importancia de esta enfermedad a nivel mundial, ha hecho que numerosos grupos de investigación enfoquen sus esfuerzos a la identificación de blancos potenciales, así como al desarrollo de nuevos fármacos; ambos aspectos se repasarán a lo largo de esta revisión.

2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y CICLO DE VIDA DE T. CRUZI

La enfermedad de Chagas técnicamente es una zoonosis; los reservorios naturales del parásito son una gran variedad de marsupiales y mamíferos del continente americano. La infección se transmite al humano por los insectos hematófagos del género *Reduviidae*. A pesar de que se han identificado más de 130 especies de triatomas capaces de transmitir el parásito al humano, tres de ellas son las más importantes, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*.

Esta parasitosis también puede ser transmitida por medios que no involucran al insecto vector, ya sea por transfusiones sanguíneas, o de la madre al hijo recién nacido, a través de la sangre. La transmisión del parásito debido a transfusiones es del 10-20%, dependiendo de la concentración de parásitos en la sangre infectada y de otros factores, como por ejemplo, la cepa del parásito. La frecuencia de transmisión congénita, es de un 5% y también depende de la cepa del parásito, así como del estado inmunológico de las madres, entre otros factores.

El parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un tripanosomátido del género Kinetoplastea. El ciclo de vida de *T. cruzi* es bastante complejo, (Fig. 1); involucra varias etapas de desarrollo tanto dentro del parásito como del insecto vector, el cual no parece verse afectado por la infección del parásito. Las formas celulares que se identifican en el hospedero mamífero son los tripomastigotes en su forma sanguínea, que no son replicativos, y los amastigotes intracelulares replicativos; mientras que, en el insecto vector se encuentran epimastigotes replicativos y tripomastigotes metacíclicos en su forma infectiva.

La enfermedad de Chagas se presenta en tres fases principales: la aguda, la indeterminada y la crónica. La fase aguda afecta comúnmente a niños y se presenta dos meses después de la infección. Durante esta fase los parásitos se multiplican como amastigotes intracelulares en los macrófagos y células tisulares en el sitio de la mordedura del insecto. En muchos de los casos, en esta fase no se presentan síntomas, o se presenta un conjunto de signos y síntomas tales como fiebre, dolores musculares, malestar generalizado, sudoración excesiva, lesiones en la piel (chagoma), inflamación de nódulos linfáticos y conjuntivitis (signo de Romana). También se puede presentar un aumento de tamaño del hígado y bazo, falla cardíaca debido a la inflamación del miocardio y en pocos casos se presentan complicaciones cerebrales, tales como meningoencefalitis. Debido a los síntomas leves, el diagnóstico puede ser determinado en solo un 10% de los casos.

En la fase indeterminada los pacientes son asintomáticos y los parásitos desaparecen del torrente sanguíneo, pero pueden ser detectados en el músculo liso y cardíaco. En muchos de los casos la enfermedad no avanza de esta fase, pero en el 30% de ellos hay una evolución hacia la fase crónica. Esta etapa se presenta con patologías graves del sistema cardíaco como arritmias severas, así como trombosis arterial y venosa. Comúnmente los pacientes con enfermedad cardíaca debido a la enfermedad de Chagas presentan un fuerte dolor en el pecho. El daño cardíaco comúnmente es biventricular. A nivel de tracto digestivo se presenta un aumento de tamaño en el esófago y colon lo que se conoce como megaesófago y megacolon, respectivamente. (3)

Desde la década de los setentas, los fármacos de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Nifurtimox y el Benznidazol. Ambos fármacos son compuestos heterocíclicos nitrogenados con un grupo nitro unido a un furano o a un anillo imidazol, respectivamente. Estos agentes funcionan como pro-fármacos y activan a

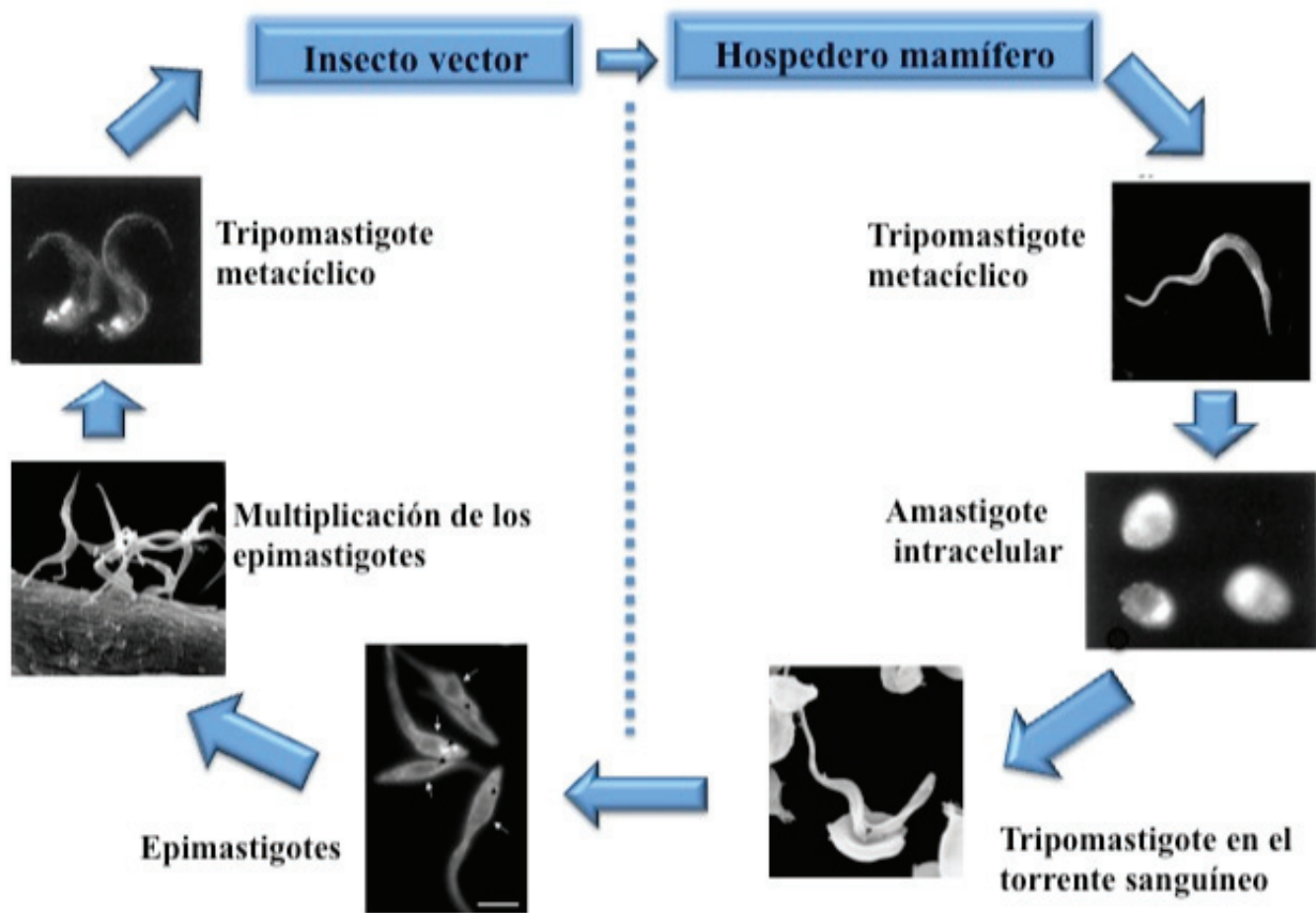


Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. En el hospedero mamífero se encuentran los tripanomastigotes no replicativos y los amastigotes intracelulares replicativos, mientras que en el insecto vector se encuentran epimastigotes replicativos y tripomastigotes metacíclicos en su forma infectiva.

las nitroreductasas generando efectos citotóxicos. El mecanismo de acción del Nifurtimox involucra la producción de radicales libres, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y metabolitos electrofílicos que afectan al parásito (4). El Benznidazol actúa inhibiendo la síntesis de proteínas y la cadena respiratoria y, se ha demostrado que los metabolitos reducidos de este fármaco unidos covalentemente a macromoléculas interaccionan con el DNA del parásito (5). Desafortunadamente, ambos fármacos solo son eficientes en la fase aguda de la enfermedad o bien en aquellos pacientes que presentan reincidencias de la infección por estar inmunosuprimidos. Este tratamiento se encuentra contraindicado en mujeres embarazadas y en pacientes con insuficiencia renal o hepática. La terapia no es del todo exitosa, debido que se produce toxicidad sistémica y efectos adversos especialmente en adultos, entre los que se encuentran pérdida de peso, náuseas, vómito, leucopenia, trombocitopenia, agranulocitosis, alteraciones dermatológicas,

como dermatitis, y, dentro las más severos, se encuentran las polineuropatías dependientes de dosis (6). También se ha reportado diferencia en la susceptibilidad a estos fármacos, dependiendo de la cepa del parásito involucrada (7).

Hasta el momento no existe algún fármaco que sea eficaz en ambas fases de la enfermedad y que además no presente efectos colaterales. De esta necesidad surgen diversos estudios a lo largo del mundo con el único propósito de encontrar el blanco terapéutico ideal y el compuesto inhibidor específico contra *T. cruzi* que no altere el metabolismo del hospedero mamífero.

3. ALGUNAS DIFERENCIAS NOTABLES ENTRE TRYPANOSOMA CRUZI Y SU HOSPEDERO MAMÍFERO

Existen diferencias importantes en el metabolismo de tripanosomátidos con respecto a su hospedero mamífero; estas peculiaridades cobran vital impor-

tancia para el diseño racional de fármacos especie-específicos, interfiriendo en el metabolismo del parásito sin afectar el del huésped mamífero. A nivel de metabolismo energético existe una diferencia notable, ya que en los tripanosomátidos gran parte de la glicólisis se lleva a cabo dentro del glicosoma, organelo especializado de origen peroxisomal. Ocho de las diez enzimas que participan en la vía se encuentran compartimentalizadas en este organelo, (Fig. 2). De manera interesante, se ha encontrado que las enzimas glicolíticas que se encuentran compartimentalizadas en el glicosoma poseen puntos isoeléctricos mayores con respecto a sus homólogas encontradas en el citosol de las células de mamífero (8). Existe una clasificación, en donde se agrupan a diversos parásitos de acuerdo a su metabolismo energético (9). *T. cruzi* fue clasificado en el grupo 4 al que pertenecen aquellos parásitos con las capacidades metabólicas más complejas. En esta categoría también se encuentran la forma procíclica de *T. brucei* y todas las etapas en el mamífero y en el hospedero de *Leishmania spp.* Estos

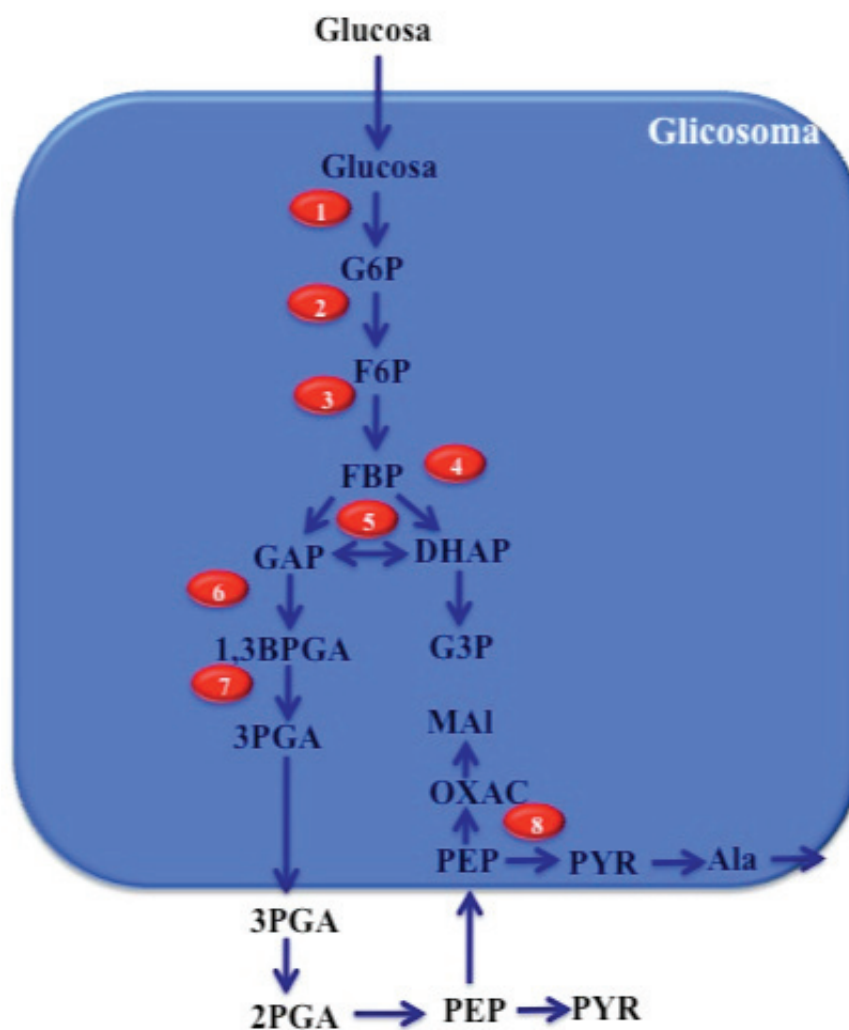
tripanosomátidos no son dependientes únicamente de la glucosa para la obtención de energía, poseen un metabolismo mitocondrial complejo y, además de glucosa, también pueden degradar aminoácidos. Así mismo, utilizan la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa para la obtención de ATP.

Los tripanosomátidos, a diferencia de sus hospederos, obtienen parte importante de su energía de la hidrólisis del pirofosfato inorgánico (PPi), la cual genera de 10 a 15 veces más energía que el ATP. El PPi se distribuye a través de la célula pero se concentra en los acidocalcisomas. Existen enzimas que se encargan de la hidrólisis del PPi, entre las que se encuentran la pirofosfatasa translocadora de protones en los acidocalcisomas y la piruvato fosfato dicinasa en el glicosoma. Por ser exclusivas del metabolismo de estos parásitos, resultan blancos importantes para el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios.

Existen dos sistemas exclusivos de tripanosomátidos, los cuales han sido objeto de numerosos estudios para el desarrollo de nuevos fármacos. El

Figura 2. Enzimas glicolíticas compartimentalizadas en el glicosoma de *T. cruzi*.

1. Hexocinasa,
2. Glucosa-fosfato isomerasa,
3. Fosfofructo cinasa,
4. Fructosa bifosfato aldolasa,
5. Triosa fosfato isomerasa,
- 6.- Gliceráldehído 3-fosfato deshidrogenasa,
7. Fosfoglicerato cinasa,
8. Piruvato fosfato dicinasa.



tripanotión y el sistema de la tripanotión reductasa se encuentran exclusivamente en los protozoarios del género *Kinetoplastea* y reemplazan al glutatión intracelular y al sistema glutatión reductasa que constituye el mecanismo principal del sistema de reducción tiol. Así mismo, el sistema de la glioxalasa está íntimamente relacionada con la ruta del tripanotión y la tripanotión reductasa, ya que en conjunto se encargan de la detoxificación del metilglioxal, metabolito citotóxico y mutagénico generado inevitablemente en la glicólisis. La glioxalasa de parásitos protistas cobra importancia como blanco para el diseño de fármacos por el hecho de que utiliza como catión divalente el níquel, mientras que la enzima de eucariotes utiliza como cofactor al zinc; de igual manera existen diferencias importantes en el sitio catalítico entre la glioxalasa de los tripanosomátidos y su contraparte en mamíferos (10).

Otro de los blancos terapéuticos de gran importancia, y exclusivos de *T. cruzi*, es la cruzipaina, proteasa específica de este parásito que se encuentra expresada en todas las fases de su ciclo de vida. Es similar a la cathepsina y es la responsable de la actividad proteolítica a lo largo de la vida de este parásito (11). Existen numerosos estudios que pretenden dilucidar el mecanismo de acción de esta proteasa con el fin de encontrar algún inhibidor capaz de inactivarla, con la consecuente muerte del parásito.

T. cruzi, al igual que muchos hongos y levaduras, requiere esteroides específicos para la viabilidad y proliferación celular en todas las etapas de su ciclo de vida (12). Por muchos años se creyó que los tripanosomátidos, al igual que células de mamíferos, sintetizaban colesterol, ya que crecían en medios suplementados con tejido de corazón o cerebro. Gracias a importantes estudios bioquímicos se llegó a la conclusión de que los tripanosomátidos sintetizaban ergosterol en lugar de colesterol por lo cual, la vía de síntesis del ergosterol se considera una ruta metabólica importante en los hongos y en los miembros del orden Trypanosomatida y ha sido un blanco importante de inhibición.

Con la liberación de los genomas completos de *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania major*, se pudieron identificar, respectivamente, 171, 156 y 179 secuencias que codifican protein-cinasas; esto ha permitido comparar estas enzimas con las correspondientes en el humano, con la finalidad de poder identificar y validar algunos posibles blancos terapéuticos. Las protein-cinasas son reguladoras importantes de muchos eventos celulares como el control transcripcional, la progresión del ciclo celular y la diferenciación, por lo que han cobrado importancia como blanco para el diseño de fár-

macos para el tratamiento de un gran variedad de enfermedades y síndromes. El genoma de las protein-cinasas de los tripanosomátidos corresponde a un tercio del total de protein-cinasas en el humano, por lo que difiere en numerosos aspectos al de su hospedero mamífero (13).

4. ALGUNOS BLANCOS TERAPÉUTICOS ESTUDIADOS PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

4.1 Enzimas que se encuentran compartimentalizadas en el glicosoma

La compartimentalización de ocho de las diez enzimas glicolíticas en el glicosoma de los tripanosomátidos es una característica muy relevante que ha permitido llevar a cabo numerosos estudios de las enzimas involucradas. La hexocinasa es la primer enzima en la vía glicolítica, en *T. cruzi* (TcHK); esta enzima no se inhibe por su principal regulador en vertebrados, la D-Glucosa 6 -fosfato. Estudios recientes demuestran la inhibición no competitiva de la TcHK por el difosfato inorgánico (PPI) con una K_i de 500 μM . Se ha identificado una familia de análogos del PPI metabólico, llamados bifosfonatos, que son inhibidores potentes y selectivos de la TcHK, además de inhibir la proliferación de amastigotes en cultivo. Se encontraron tres compuestos: el (9-etil-9H-3-carbazolil)-amino-metileno-1,1-bifosfonato, $\text{IC}_{50} = 0.81 \mu\text{M}$, el (3-bromo-fenil)-amino metileno-1,1-bifosfonato, $\text{IC}_{50} = 0.95 \mu\text{M}$ y el (2-(piridin-4-il)-1-hidroxietano-1,1-bifosfonato, $\text{IC}_{50} = 12.7 \mu\text{M}$, que inhiben a la TcHK de manera mixta y no competitiva; además de presentar un efecto selectivo contra la forma intracelular amastigote. Estos compuestos tienen un ligero efecto en el crecimiento de células de una línea celular humana por lo que representan una novedosa clase de agentes antiparasitarios que inhiben de manera selectiva la actividad de la hexocinasa (14).

Una de las enzimas glicolíticas glicosomales más estudiadas, es la triosafosfato isomerasa (TIM) que cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato. Existen numerosos estudios de la TIM de *T. cruzi* (TcTIM) ya que posee algunas peculiaridades y diferencias con respecto a la TIM de humano (HuTIM). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de ambas enzimas presentan una identidad del 52%, (Fig. 3). La TcTIM, enzima catalíticamente activa sólo en su forma dimérica, ha sido propuesta como blanco para el diseño de fármacos; particularmente se ha tenido gran interés en la interfase, que se encuentra entre los dos monómeros, y que está constituida por 32 aminoácidos. Si bien los sitios

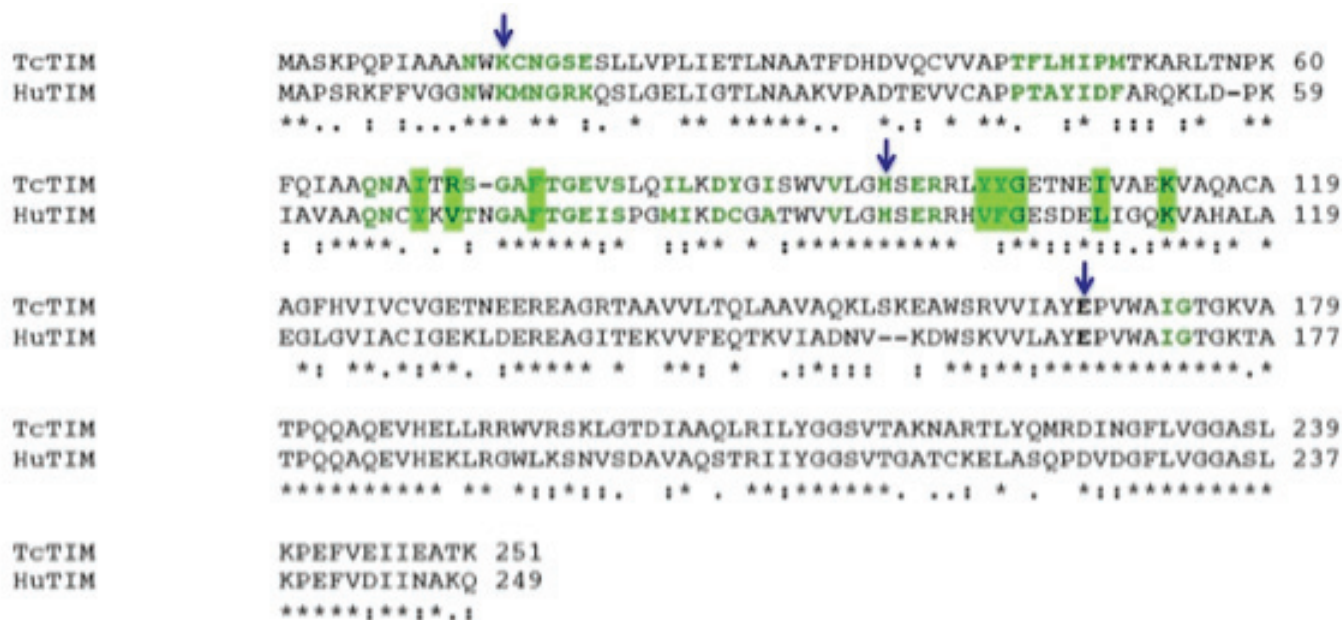


Figura 3. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las triosasfosfato isomerasas de *T. cruzi* (TcTIM) y Humano (HuTIM). Ambas enzimas poseen un 52% de identidad. Con flechas se indican los aminoácidos del sitio catalítico, en verde los aminoácidos de la interfase y resaltados en verde los aminoácidos de la cavidad hidrofóbica de la interfase. El alineamiento se llevó a cabo utilizando el programa Clustal W.

catalíticos son altamente conservados, las interfases de los oligómeros lo son menos, por lo que estas regiones pueden ser utilizadas como blancos para el diseño de fármacos. En la interfase de TcTIM existe una cavidad hidrofóbica conformada por 8 aminoácidos. En HuTIM, solo tres de los ocho residuos en esta cavidad son idénticos a los de TcTIM (Fig 3). Partiendo de estas diferencias se han sintetizado algunos compuestos derivados de benzotiazoles con resultados prometedores. Entre los compuestos más eficaces se encuentra el 6,6'-benzotiazol-2,2'-diamina que, en concentraciones del orden micromolar, causa inactivación reversible en TcTIM y las TIM de *T. brucei* (TbTIM) y de *L. mexicana* (LmTIM). Estas TIM comparten un 82% de identidad en los residuos de la interfase y un 88% en la cavidad hidrofóbica, y no así con las TIM con una cavidad hidrofóbica diferente, entre las cuales se encuentra HuTIM (15). Otro compuesto que ha resultado eficaz en la inhibición específica de TcTIM es la ditiodianilina (DTDA), se requiere de una concentración de 260 nM para inhibir la actividad de TcTIM, mientras que la actividad de TbTIM, LmTIM y HuTIM a estas concentraciones se mantiene intacta. Este compuesto resultó también eficaz en la inhibición del crecimiento de *E. coli* transformada con un plásmido con el gen de TcTIM reemplazando a la TIM bacteriana, lo que demostró que la DTDA es capaz de atravesar membranas biológicas. Utilizando concentraciones que van desde

4 a 8 μ M provocó la muerte de epimastigotes de *T. cruzi*. A pesar de que este compuesto presenta varios efectos citotóxicos, puede servir como molécula líder en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad tripanosomacida debido a su efecto específico en TcTIM y a las interacciones que provoca en la estructura de la enzima (Fig. 4), (16).

Con el fin de buscar moléculas que interfieran con la interfase del dímero de la TIM, en un estudio reciente se probó la inhibición de la actividad de TcTIM con una biblioteca de 230 compuestos de diferentes quimotipos. Se identificaron cuatro tipos de compuestos: 1,2,6-tiadiazinas, fenazinas, 5,9-dióxidos y tiazoles, que presentaron mayor selectividad por la TcTIM que la HuTIM. Se probó la actividad de estos compuestos contra *T. cruzi* y la fenazina 5,9-dióxido fue el más eficaz en matar a *T. cruzi* (17).

La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de tripanosomátidos también presenta importantes diferencias con respecto a la GAPDH humana. La GAPDH cataliza la fosforilación oxidativa del gliceraldehído 3-fosfato a 1-3 difosfoglicerato en presencia de NAD^+ y fosfato inorgánico. El análisis de las estructuras cristalográficas de las GAPDH de *T. brucei*, *L. mexicana*, *T. cruzi* y del humano revelaron diferencias sobresalientes alrededor del sitio de unión del NAD^+ . La GAPDH de humano, así como la de tripanosomátidos, poseen una región en la cual se puede acomodar el

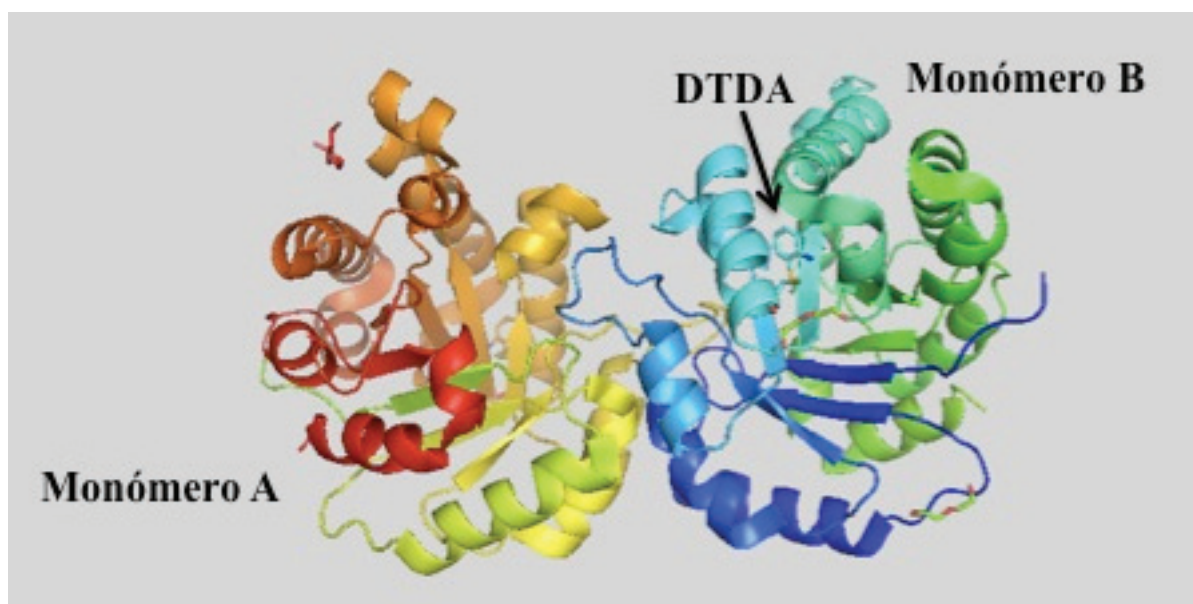


Figura 4. Localización del DTDA (2,2-ditiodianilina) en la estructura cristalográfica de TcTIM. La figura se preparó utilizando el programa PYMOL con las coordenadas depositadas en el PDB con el código 2OMA.

grupo hidrofóbico N⁶ de la adenosina. Estos sitios son idénticos en estas dos enzimas, excepto que la cavidad en la enzima de los tripanosomátidos es más hidrofóbica que la de la enzima del humano. Una de las sustituciones que contribuyen de manera importante a una mayor hidrofobicidad es la de una valina en la posición 113 en la enzima humana que corresponde a una leucina en la GAPDH de tripanosomátidos. De esta manera se diseñaron compuestos análogos a adenosina con el propósito de bloquear selectiva y competitivamente la unión del NAD⁺ a las GAPDH de los tripanosomátidos. De manera particular el análogo de adenosina N6-(1-naftalenmetil)-2'-(3-clorobenzamida) inhibió el crecimiento de cultivos de amastigotes de *T. cruzi* con una ED₅₀ de 3 μ M (18).

Partiendo del hecho de que el control de la infección por *T. cruzi* en el huésped mamífero es dependiente de la activación de macrófagos y de la producción de óxido nítrico (NO), con la consecuente destrucción del parásito, se han diseñado novedosos compuestos de rutenio, que contienen donadores de NO, a los que se les ha evaluado sus efectos en cultivos celulares, en modelos animales de la enfermedad de Chagas y en su eficacia para inhibir la actividad de la GAPDH de *T. cruzi*. Los compuestos de rutenio más eficaces fueron cis-[Ru(NO)(bpy)2imN](PF₆)₃, cis-[Ru(NO)(bpy)21-miN](PF₆)₃ y cis-[Ru(NO)(bpy)2SO₃](PF₆)₃ con porcentajes de inhibición del 85 al 97% a una concentración de 200 μ M. Los valores de IC₅₀ para estos compuestos son de 89, 97 y 153 μ M,

respectivamente. La eficacia de estos compuestos no solo fue a nivel de la actividad de la GAPDH, si no que también son letales para cultivos de tripomastigotes, epimastigotes y células infectadas con el parásito en su forma amastigote. De igual manera, se sugiere que el mecanismo de acción de estos compuestos de rutenio puede ser mediante la S-nitrosilación de la cisteína 166 del sitio catalítico de la GAPDH de *T. cruzi* (19).

Muchas de las rutas metabólicas que se llevan a cabo en el glicosoma, son dependientes de la producción de PPI. La hidrólisis del PPI por las pirofosfatasas libera mucha energía que permite que se lleven a cabo reacciones con alto consumo de energía, sin embargo no se ha detectado actividad de pirofosfatasa, ni en la forma sanguínea de *T. brucei*, ni en amastigotes de *T. cruzi*. En algunos parásitos, incluyendo los tripanosomátidos, se ha encontrado la enzima piruvato fosfato dicinasa (PPDK). Se ha confirmado la localización de la TcPPDK en el glicosoma y, además, al no detectarse pirofosfatasa en la fracción glicosomal, se ha pensado que la TcPPDK solo trabaja en la dirección de consumo de fosfoenol piruvato (PEP) y PPI (20).

4.2 El sistema del tripanotión, la tripanotión reductasa y la glioxalasa

El tripanotión, junto con la tripanotión reductasa, sustituye al sistema del glutatión/glutatión reductasa (GSH/GR) y ambos se encargan de las funciones antioxidantes que regulan el balance tiol-

redox en los tripanosomátidos. Así como otros organismos, estos parásitos se encuentran expuestos a especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que la ausencia de la ruta de la GR, que se encuentra en el huésped mamífero, convierte a las enzimas involucradas en el metabolismo del tripanotión en blancos potenciales para el desarrollo de fármacos especie-específicos contra tripanosomátidos. La biosíntesis del tripanotión involucra dos reacciones: en primer lugar se lleva a cabo la síntesis del conjugado glutationil-espermidina, con la consecuente síntesis del tripanotión en una segunda reacción. En *T. brucei*, la espermidina se sintetiza a partir de la ornitina vía la putrescina que, subsecuentemente, se coordina con el GSH para dar origen a la glutationil-espermidina y posteriormente al tripanotión. De manera peculiar, en epimastigotes de *T. cruzi*, no hay síntesis de novo de las poliaminas a partir de precursores aminoacídicos, por lo que se importa cadaverina y putrescina del exterior para ser convertidos via espermidina, o aminopropilcadaverina, en tripanotión y homotripanotión, respectivamente. En el parásito *Crithidia fasciculata* se han identificado dos enzimas involucradas en la síntesis del tripanotión: la glutationil-espermidina sintetasa y la tripanotión sintetasa (21). De manera contraria a lo encontrado en *C. fasciculata*, en *T. cruzi* se reportó que una sola enzima: la tripanotión sintetasa (TcTryS), lleva a cabo tanto la síntesis de la glutationil-espermidina, como la formación del tripanotión, y, además, se demostró que esta enzima tiene una doble función de sintetasa y amidasa capaz de hidrolizar tripanotión, homotripanotión y glutationil-espermidina, actividades que no se han observado en ningún tripanosomátido. Debido a lo antes descrito, esta enzima resulta un blanco importante para el diseño de nuevos fármacos específicos contra *T. cruzi* (22). La TcTryS tiene un amplio rango de especificidad de sustratos, ya que puede sintetizar tripanotión mediante la conjugación de glutatión con otras poliaminas fisiológicas diferentes a la espermidina; esto resulta favorable para el parásito ya que, como se mencionó antes, en *T. cruzi* no se lleva a cabo síntesis de novo de poliaminas. Esta característica resulta importante en el diseño de fármacos, ya que se pueden diseñar inhibidores del metabolismo tripanotión utilizando el esqueleto de poliaminas (23).

Otra enzima involucrada en el equilibrio redox es la tripanotión reductasa (TryR) la cual, en *T. cruzi*, también presenta diferencias notables en la especificidad de sustrato comparada con la glutatión reductasa del huésped mamífero. Existen varios estudios tomando como base la estructura de esta enzima en la que se han identificado algunos compuestos con potencial actividad antiparasitaria

contra *T. cruzi*. Utilizando un método híbrido, que combina el análisis de similitudes de ligandos y docking computacional, se pudo identificar una biblioteca de 603 moléculas con posible unión a la TryR. Con 19 de ellas se hicieron estudios de inhibición de la actividad TryR de *T. cruzi* y *T. brucei*, obteniendo valores de IC₅₀ menores a 100 μ M. Estos compuestos pertenecen a quimotipos con actividad antitripanosomal que no se habían reportado antes tales como: dibenzotiepinas, dibenzoxatiepinas, dibenzoditiepinas, y tiazatetraciclo, 2,4,6-trioxohexahidropirimidinas (24).

El sistema de la glioxalasa se encuentra también involucrado en la detoxificación de los tripanosomátidos. Está constituido por dos enzimas, glioxalasa I (GLO1) y glioxalasa II (GLO2); ambas enzimas requieren de un cofactor tiol para llevar a cabo su función. Este sistema enzimático se encarga principalmente de la detoxificación del metil glioxal, un α -oxoaldehído altamente tóxico, que se genera como subproducto en la glucólisis y en el metabolismo de la treonina, con capacidad citotóxica, citostática y mutagénica (10). Se han identificado las glioxalosas de *T. brucei* (TbGLO2 (25)), *L. major* (LmGLO1 (26)), y *T. cruzi* (TcGLO1, (27)). Las tres son enzimas que dependen del tripanotión para su actividad y utilizan como cofactor níquel, mientras que la enzima homóloga en el humano utiliza Zinc. En el extremo aminoterminal de la glioxalasa de los tripanosomátidos existe un residuo de histidina conservado, que indica que posee el sitio de unión a níquel, mientras que, en la enzima del humano y del ratón se encuentra una glutamina en la misma posición, la cual confiere la selectividad por zinc (10). Si bien TcGLO1 utiliza preferencialmente níquel para activarse, a diferencia de LmGLO1 y TbGLO2, utiliza otros cationes divalentes como cobalto, manganeso y zinc (nombrados en orden de preferencia). Esta versatilidad probablemente se deba a la diferente biodisponibilidad de cofactores metálicos en las células del hospedero mamífero o en el insecto vector. TcGLO1 tiene una especificidad por sustrato mucho mayor por hemitioacetales de tripanotión y glutationilespermidina que por hemitioacetales de glutatión, que son los sustratos de elección de la glioxalasa de humano. De estos dos sustratos, TcGLO1 tiene mayor afinidad por los aductos de glutationilespermidina de metilglioxal o feniloxal. Esta especificidad de sustrato, y la diferencia con las especificidades de la enzima humana, se relaciona directamente con las diferencias estructurales encontradas en el sitio activo. Los aminoácidos involucrados en la especificidad de la glioxalasa humana por hemiacetales de glutatión se encuentran en un asa formada entre los residuos Pro 102 y Val

109; cuatro de estos residuos no se encuentran en la correspondiente región de la glioxalasa I de los tripanosomátidos. La ausencia conservada de estos residuos está directamente relacionada con la especificidad de la glioxalasa I en parásitos por hemiacetales de tripanotión (26). Debido a la alta afinidad de la TcGLO1 por los aductos de glutatiónil-espermidina se probó el efecto inhibitor de la (S)-4-Bromobencil-glutathionil-espermidina, la cual presentó una inhibición competitiva con respecto al hemitioacetal tripanotión. Esta inhibición es 10 veces mayor comparada con la enzima homóloga en *L. major*. A partir del esqueleto de la glutatiónil-espermidina, se pueden diseñar moléculas eficaces para la inhibición específica de la TcGLO1 (27).

4.3 Proteasa específica de *T. cruzi*: la cruzipaina

Uno de los blancos terapéuticos más estudiados en contra de la enfermedad de Chagas es la cruzipaina, una cisteín-proteasa miembro de la familia

papaína C1. Se ha comprobado que esta proteasa es crítica para la viabilidad del parásito, además de cumplir una función muy importante en la capacidad del parásito para invadir tejidos y evadir la respuesta inmune. Esta proteasa se expresa en todas las etapas del ciclo de vida de *T. cruzi*, pero su localización varía de acuerdo a la etapa. En el epimastigote, la proteasa se encuentra en el lisosoma, en el amastigote se encuentra tanto en el lisosoma como en la superficie del parásito. Uno de los inhibidores más estudiados, que, incluso, se encuentra actualmente en estudios preclínicos, es el K777, (Fig. 5A). Se ha probado que el blanco selectivo del K777 es la cruzipaina y que resulta efectivo para curar infecciones por *T. cruzi* en modelos en ratones de infección aguda y no aguda, de igual manera tiene un efecto importante en la disminución del daño cardíaco en perros. Al escalar las dosis utilizadas en estos modelos para estimar la dosis que puede ser usada en el humano se predijo que aproximadamente una dosis oral de 10 mg/kg durante 14-30 días puede ser efectivo para

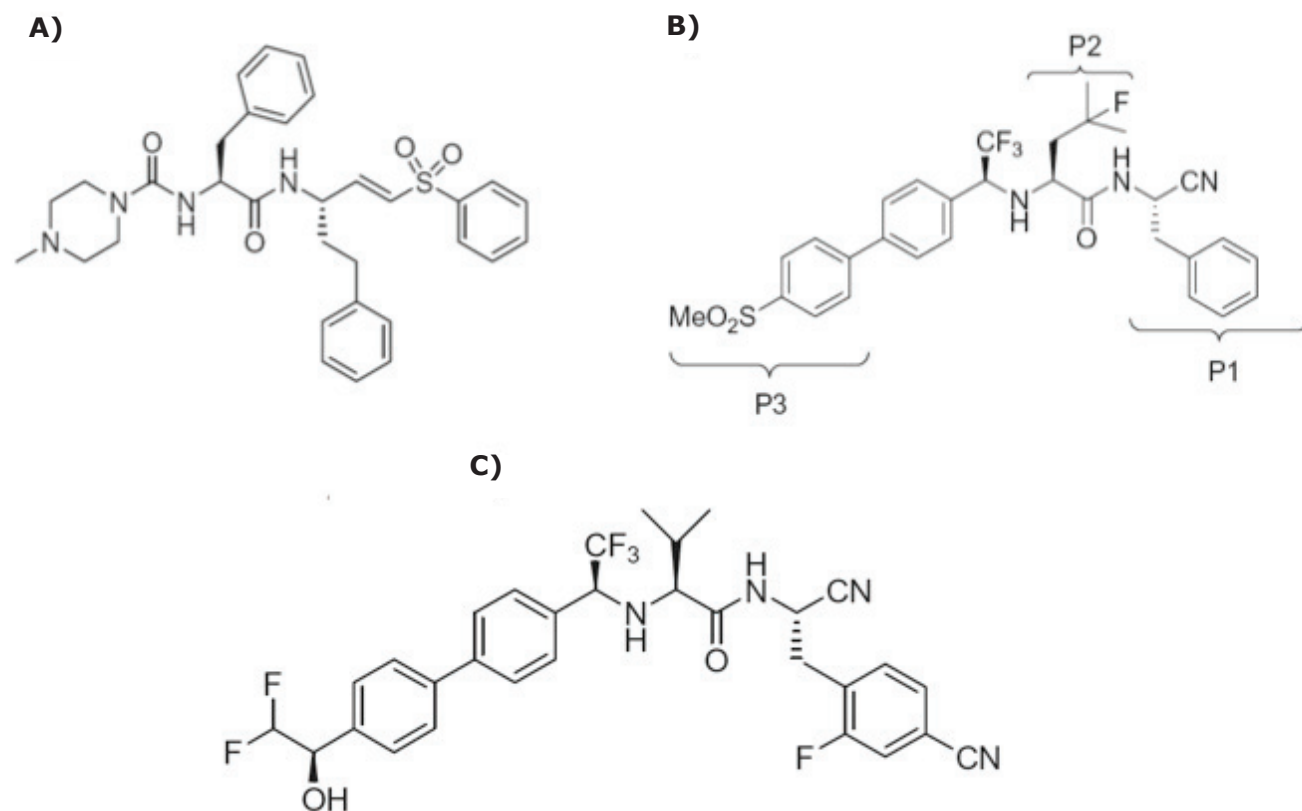


Figura 5. Fórmulas químicas desarrolladas de compuestos inhibidores específicos de la cruzipaina de *T. cruzi*. Panel A: Estructura del inhibidor K777 de la cruzipaina N-metilpiperazina-Fenilalanina-homoFenilalanina-vinilsulfona-fenil. Panel B: Esqueleto de inhibidores reversibles de la cruzipaina con 3 porciones P1, P2 y P3 que equivalen a sustituyentes diferentes. Panel C: Estructura del inhibidor reversible más efectivo de la cruzipaina reportado por Beaulieu C., et al 2010 (30).

implantar un régimen terapéutico contra la enfermedad de Chagas. En el 2005, se detuvieron los estudios para establecer como fármaco de elección al K777 debido a que en estudios de toxicidad, se presentó una importante elevación de la alanina aminotransferasa (ALT) que indica hepatotoxicidad. A partir de este año el NIAID (siglas en inglés del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas) ha empezado la producción de grandes cantidades de este compuesto con el fin de iniciar estudios de fase I en humanos voluntarios sanos (28).

Existen varios estudios enfocados a identificar inhibidores irreversibles que se unan covalentemente a la proteasa. Estos inhibidores contienen grupos electrofílicos entre los cuales se encuentran las peptidildiazometilcetonas, peptidilfluorometilcetonas y peptidil vinil sulfonas. Estos inhibidores son capaces de bloquear la diferenciación del parásito en las distintas fases de su ciclo de vida. El derivado vinil sulfónico, la N-piperazina-Fenil-hFenil-vinil sulfona fenil resultó ser un excelente inhibidor de la cruzipaína, ya que provocó la muerte de los parásitos mediante la inducción de la acumulación de la proteasa no procesada en el aparato de Golgi. A su vez este compuesto fue probado *in vivo* en modelos murinos de la enfermedad (11). Desafortunadamente los inhibidores irreversibles también inhiben las cisteína-proteasas del huésped por lo que pudieran presentar severos efectos adversos relacionados con la unión covalente a estas proteasas. Algunos otros grupos de investigación han desarrollado inhibidores reversibles específicos a la cruzipaína. La cruzipaína se relaciona directamente con la familia de las catepsinas. Tomando como esqueleto inhibidores reversibles no básicos de las catepsinas, se han identificado potentes inhibidores reversibles para la cruzipaína. El esqueleto de esta serie de inhibidores se muestra en la figura 5 B, esta estructura se dividió en tres porciones que se ilustran como P1, P2 y P3 y se estudió cual era la naturaleza ideal de los sustituyentes en cada posición. Se demostró que la presencia de un motivo parecido a la fenilalanina era muy importante y el mejor sustituyente fue el 4-ciano-2fluoro-fenilalanina, que presentó un incremento de ocho veces en potencia con respecto a la fenilalanina no sustituida. El mejor sustituyente en la posición P3 fue el 4-metanosulfonil bifenilo. Estudios previos habían demostrado que los grupos funcionales posicionados en P2 determinaban la selectividad entre la cruzipaína y las catepsinas (29). El mejor sustituyente en esta posición resultó ser una valina con una potencia de 2 nM y una selectividad de 80 veces por la cruzipaína sobre las catepsinas humanas L,B y F. Una vez seleccionados los mejo-

res sustituyentes en P1,P2 y P3; el inhibidor más potente (en el rango nanomolar), selectivo y eficaz contra la cruzipaína se muestra en la figura 5C, con él se han hecho estudios de biodisponibilidad en perros y ratas con excelentes resultados. El compuesto presenta tiempos de vida media en ambas especies de 5.2 y 4.6 horas, respectivamente. Este compuesto resulta un buen candidato para estudios posteriores en el diseño de inhibidores reversibles y específicos contra la cruzipaína (30).

4.4 La ruta de biosíntesis del ergosterol

Los esteroides son los principales constituyentes de las membranas celulares, esenciales para su estructura y función. En las células de mamífero el colesterol es el principal esteroide que constituye las membranas, mientras que en otros organismos como hongos y protozoos predominan otro tipo de esteroides. En el caso de los tripanosomátidos se sintetiza ergosterol en lugar de colesterol. La ruta de la síntesis de esteroides en estos parásitos ha tomado gran importancia en el diseño de fármacos antiparasitarios. En esta ruta metabólica se producen una clase especial de esteroides, entre los que se incluye el ergosterol y otros 24 metil-esteroides que son importantes para el crecimiento y viabilidad de los parásitos y, aún más importante, estas rutas no se encuentran en el hospedero mamífero. Los epimastigotes de *T. cruzi* contienen alrededor de 40% de ergosterol y ergosta-5,7-dien-3 β -ol y una cantidad apreciable, alrededor del 30% de estigmasta-5,7-dien-3 β -ol, y estigmasta-5,7,22-trien-3 β -ol. En el amastigote, no hay producción de esteroides 5,7 y son sustituidos por ergosta-7-en-3 β -ol y 24-etilidonacolest-7-en-3 β -ol.

Existen muchos fármacos que interfieren el ruta de biosíntesis de esteroides, incluso algunos de ellos se utilizan para disminuir los niveles de colesterol en los humanos. Cobran importancia aquellos fármacos que con fines antiparasitarios inhiben la síntesis de esteroides sin afectar la correspondiente ruta en el humano. Tal es el caso de las alilaminas, inhibidores de la escualeno epoxidasa, de las cuales el principal ejemplo es la terbinafina que inhibe a la escualeno epoxidasa, con la consecuente disminución del ergosterol. Otro ejemplo son los azosteroides que inhiben a la esteroide aminotransferasa; sin embargo se ha demostrado que estos compuestos tienen efectos supresores, pero no curativos, en contra de las infecciones de *T. cruzi* en humanos o en animales experimentales y son incapaces de detener la progresión de la enfermedad (31).

En los últimos años se han desarrollado nuevos derivados triazólicos como el D0870 y el posaconazol (POS), que son inhibidores selectivos del

citocromo P450 dependiente de la C14 α -lanosterol desmetilasa (CYP51), y se ha encontrado que tienen actividad antiparasitaria en modelos murinos de la enfermedad de Chagas tanto en sus fase aguda como crónica (32). Además, estos compuestos son capaces de erradicar las cepas resistentes de *T. cruzi* contra nitrofurano y nitroimidazol en ratones infectados. Otros estudios con el POS, que es un análogo estructural del itraconazol, demostraron que este compuesto es capaz de erradicar los amastigotes intracelulares en cultivos de cardiomiocitos sin efecto alguno en el ensamblaje del citoesqueleto en las células del hospedero (33). El POS fue registrado en el 2005 en la Unión Europea y en Australia como alternativa en el tratamiento y en 2006 en los Estados Unidos de América para ser usado en la profilaxis de infecciones fúngicas; en el 2010 comenzaron los estudios clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, convirtiéndose en el primer fármaco diseñado racionalmente que se encuentra en estudios clínicos para el tratamiento de esta enfermedad. Algunos otros triazoles como el TAK-187 (Takeda Chemical Company), el UR-9825 (Uriach & Company) y el ravuconazol (ER-30346, EisaiCo.;BMS207,147;Bristol Myers Squibb) presentaron actividad tripanosomacida tanto *in vitro* como *in vivo*. El más efectivo de los tres es el TAK-187, que es capaz de curar la enfermedad en sus dos fases, aún en las cepas resistentes a nitrofurano y nitroimidazol. Los otros dos derivados triazólicos poseen tiempos cortos de vida media en modelos animales por lo que son fármacos supresores, pero no curativos, de la enfermedad de Chagas (34).

Recientemente, se reportó una nueva clase de inhibidores de CYP51, enzima que cataliza la conversión de lanosterol a ergosterol. Estos compuestos fueron diseñados con base en el esqueleto de N-[4-piridil]-formamida, que fue obtenida a partir de los estudios estructurales de CYP51 de *Mycobacterium tuberculosis*. Uno de estos compuestos fue capaz de erradicar amastigotes intracelulares crecidos en cultivos de macrófagos de ratón (35). Debido a que el porcentaje de identidad entre la CYP51 de *M. tuberculosis* y la correspondiente en *T. cruzi* es tan solo del 27%, fue necesario obtener la estructura cristalográfica de CYP51 de tripanosomátidos. En un estudio del 2010 se reportaron las estructuras de CYP51 de *T. cruzi* y *T. brucei*, que revelaron importantes aspectos estructurales de la unión de 2 de los inhibidores más importantes de esta enzima: el Posoconazol (POS) y el Fluconazol. Ambos compuestos se unen al sitio activo de CYP51 mediante la coordinación del grupo hemo con el nitrógeno aromático del anillo triazólico, además de múltiples interacciones de van der Waals y de

tipo hidrofóbico. De manera importante en el sitio de unión de los inhibidores se forma un puente hidrofóbico constituido por 42 aminoácidos, en donde se encontraron importantes diferencias que definen la selectividad de estos compuestos. Tal es caso de los aminoácidos 209 y 462 que, en los tripanosomátidos, corresponden a prolina y valina, respectivamente, mientras que en CYP51 de humano ambos aminoácidos son histidinas (36).

Otra clase de compuestos que interfieren en la biosíntesis de esteroides son los inhibidores de la escualeno sintasa (SQS, de sus siglas en inglés Squalene synthase). Esta enzima cataliza el primer paso en la biosíntesis del esteroide y ha sido validada como un blanco quimioterapéutico en *T. cruzi* y *L. mexicana* (37). Aunque algunos compuestos han resultado potentes en su actividad anti-*T. cruzi*, también son potentes inhibidores de la SQS de mamíferos, de tal forma que se requieren inhibidores específicos de la SQS de tripanosomátidos. En este sentido, en un estudio reciente se reportó la clonación del gen de la SQS de *T. Cruzi*, que fue sobreexpresada y purificada a partir de células de *E. coli*, y ha sido utilizada en la identificación de inhibidores de la SQS (38). El compuesto llamado WC-9 (4-fenoxi fenoxi etiltiocianato), actúa inhibiendo selectivamente la SQS de *T. cruzi* (39).

Un acercamiento muy interesante en este campo es la generación de moléculas con doble función, debido a que en su estructura poseen dos farmacóforos: por un lado un radical nitrofurano que permite la generación de radicales libres y una porción heteroalil que inhibe la escualeno epoxidasa con la consecuente acumulación de escualeno (40). Estos compuestos resultaron ser muy activos contra las formas intracelulares y extracelulares del parásito y aún más potentes que el nifurtimox y la terbinafina presentando valores de ID₅₀ aproximados a 2.0 μ M (41).

4.5 La liberación del genoma de *T. cruzi* y estudios en proteincinasas como blancos terapéuticos

Las proteínas-cinasas (PK de sus siglas en inglés Protein Kinases) regulan gran variedad de eventos celulares. Con la liberación de los genomas completos de los tripanosomas, se han podido identificar 171 secuencias que codifican para PK en el genoma de *T. cruzi*. Estas enzimas se han clasificado en siete grandes grupos para facilitar su estudio, de los cuales el más abundante en los tripanosomátidos es la familia de las CMGC, cinasas que incluyen a las cinasas dependientes de Ciclina (CDK), a las cinasas activadas por mitógeno (MAP-cinasas), a las glucógeno sintasas cinasas (GSK)

y a las cinasas con actividad parecida a las CDK (CDK-like). En el genoma de *T. cruzi* se encontraron 10 secuencias que codifican para CDK, que son dependientes de ciclina para su activación (13). La actividad de las CDK en *T. cruzi* está regulada tanto por ciclinas como por fosforilación, de la misma manera que en el humano. Solo dos de estas CDK han sido caracterizadas, TzCRK1 y TzCRK3, y se ha demostrado que interactúan con ciclinas del mamífero confirmando su naturaleza de cinasas dependientes de ciclina (42).

La CK1 es una cinasa que pertenece al grupo de las casein cinasas y que se ha identificado en *T. cruzi*; tiene importancia por el hecho de que es selectivamente inhibida por derivados del purvalanol B, mientras que la CK1 de mamífero no une este compuesto en ninguno de los tejidos probados (43). Los derivados del purvalanol si inhiben a la CK1 de mamífero pero con una potencia 1000 veces menor que la CK1 de *L. mexicana* y *T. cruzi*. Estos hechos definen a la CK1 de *T. cruzi* como un blanco importante para el desarrollo de nuevos fármacos.

5. CONCLUSIONES

Han pasado más de 100 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas y alrededor de 70 años de que se comenzaron los estudios para encontrar fármacos eficaces contra esta enfermedad. Hasta el momento, los dos fármacos de elección no son eficaces en las dos fases de la enfermedad, además de presentar importantes efectos

secundarios. A lo largo de estos años, se han identificado numerosos blancos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios mediante atractivas estrategias y acercamientos experimentales novedosos. La propia naturaleza de *T. cruzi* ha permitido un avance importante en esta búsqueda, los estudios más sobresalientes se centran en las diferencias que presenta este parásito con respecto a su hospedero mamífero. Es importante resaltar que de estas diferencias, las más exploradas incluyen las enzimas glucolíticas compartimentalizadas en el glicosoma, el sistema del tripanotión, la cruzipaína y la síntesis del ergosterol. Estos estudios han permitido caracterizar a la perfección, tanto estructural como cinéticamente un sinúmero de enzimas como la TIM o la GAPDH y explorar variedad de bibliotecas de fármacos con actividad específica para la CYP51 o la SQS. Por ejemplo, entre los estudios más avanzados se encuentran los estudios en fases preclínicas del K777 y su inhibición específica de la cruzipaína. Con la liberación del genoma de *T. cruzi* en el 2005 se inició una nueva era de investigación en la enfermedad de Chagas, que permite la comparación de genomas completos para identificar blancos potenciales con fines terapéuticos. Esta búsqueda no ha concluido, la generación de cepas resistentes a los fármacos de elección mantienen alertas a los grupos de investigación a lo largo del mundo, en busca del fármaco ideal contra la enfermedad de Chagas.



REFERENCIAS

1. Aufderheide AC, W Salo M, Madden J, Streitz J, Buikstra F, Guhl B, Arriaza C, Renier L, E Wittmers, Jr., G Fornaciari, M Allison (2004) A 9000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci USA 101:2034-2039.
2. Bernstein RE (1984) Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. J R Soc Med 77(7): 608-609.
3. Wilkinson SR, Kelly JM.(2009) Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. Expert Rev Mol Med 11:e31.
4. Maya J, Cassels B, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A (2006) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 146:601-620.
5. Faundez M, Pino L, Letelier P, Ortiz C, López R, Seguel C, Ferreira J, Pavani M, Morello A, Maya JD (2005) Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother 49:126-130.
6. Apt W (2010) Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. Drug Design, Development and Therapy 4:243-253.
7. Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR, Nirdé P, Bruna-Romero O, Goldenberg S, Romanha AJ (2006): Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 146, 151-162.

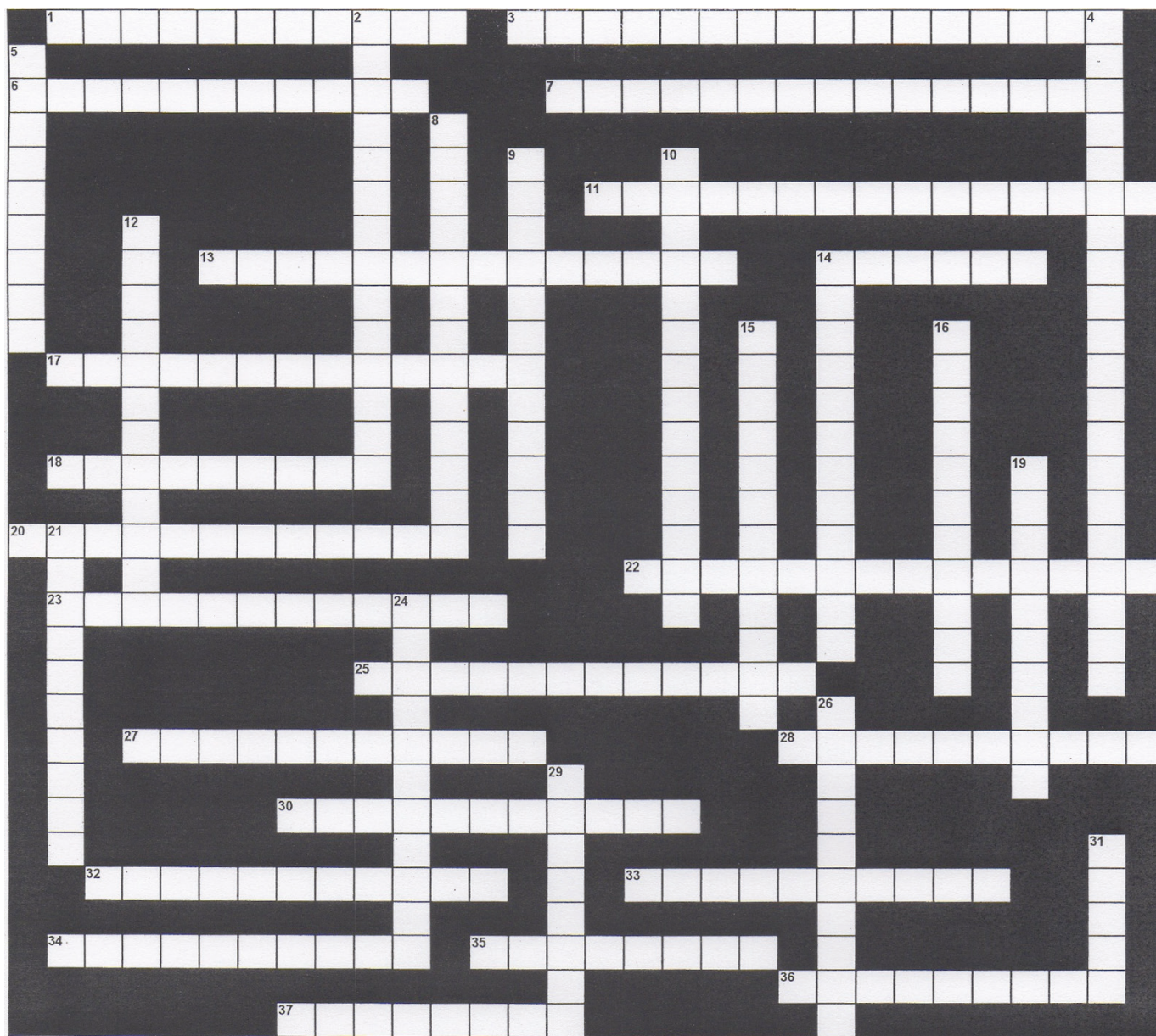
8. de Souza W (2002). Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res* 88:1013-1025.
9. Tielens AG, van Hellemond JJ (2009) Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends Parasitol* 25:482-90.
10. Chauhan SC, Padmanabhan PK, Madhubala R (2008) Glyoxalase pathway of trypanosomatid parasites: a promising chemotherapeutic target. *Curr Drug Targets* 9:957-965.
11. Jose Cazzulo J, Stoka V, Turk V (2001) The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des* 7:1143-1156
12. Urbina JA (2009) Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1:311-318.
13. Naula C, Parsons M, Mottram JC (2005) Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* 1754:151-159.
14. Sanz-Rodríguez CE, Concepción JL, Pekerar S, Oldfield E, Urbina JA (2007). Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase: kinetic and metabolic studies. *J Biol Chem* 282:12377-12387.
15. Olivares-Illana V, Pérez-Montfort R, López-Calahorra F, Costas M, Rodríguez-Romero A, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez Puyou A (2006) Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. *Biochemistry* 45:2556-2560.
16. Olivares-Illana V, Rodríguez-Romero A, Becker I, Berzunza M, García J, Pérez-Montfort R, Cabrera N, López-Calahorra F, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A (2007) Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 1(1): e01. doi:10.1371/journal.pntd.0000001.
17. Alvarez G, Aguirre-López B, Varela J, Cabrera M, Merlino A, López GV, Lavaggi ML, Porcal W, Di Maio R, González M, Cerecetto H, Cabrera N, Pérez-Montfort R, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A (2010). Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Eur J Med Chem* 45:5767-5772.
18. Aronov AM, Suresh S, Buckner FS, Van Voorhis WC, Verlinde CL, Oppender FR, Hol WG, Gelb MH (1999) Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96:4273-4278.
19. Silva JJ, Guedes PM, Zottis A, Balliano TL, Nascimento Silva FO, França Lopes LG, Ellena J, Oliva G, Andricopulo AD, Franco DW, Silva JS (2010) Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. *Br J Pharmacol* 160:260-269.
20. Acosta H, Dubourdieu M, Quiñones W, Cáceres A, Bringaud F, Concepción JL (2004) Pyruvate phosphate dikinase and pyrophosphate metabolism in the glycosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 138:347-356.
21. Smith K, Nadeau K, Bradley M, Walsh C, Fairlamb AH (1992) Purification of glutathionyl-spermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. *Protein Sci* 1:874-883.
22. Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Warron SS, Fairlamb AH (2002) A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 277:35853-35861.
23. Ariyanayagam MR, Oza SL, Mehlert A, Fairlamb AH (2003) Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 278:27612-27619.
24. Perez-Pineiro R, Burgos A, Jones DC, Andrew LC, Rodriguez H, Suarez M, Fairlamb AH, Wishart DS (2009) Development of a novel virtual screening cascade protocol to identify potential trypanothione reductase inhibitors. *J Med Chem* 52:1670-1680.
25. Irsch T, Krauth-Siegel RL (2004) Glyoxalase II of African trypanosomes is trypanothione-dependent. *J. Biol. Chem* 279:22209-22217.
26. Vickers TJ, Greig N, Fairlamb AH (2004) A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101:13186-13191.
27. Greig N, Wyllie S, Vickers TJ, Fairlamb AH (2006) Trypanothione-dependent glyoxalase I in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 400:217-223.
28. McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, Ferreira R, Saxton T, Arkin M, Kerr ID, Brinen LS, Craik CS (2009) Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 Suppl 1:263-269.
29. Gauthier JY, Chauret N, Cromlish W, Desmarais S, Duong le T, Falgout JP, Kimmel DB, Lamontagne S, Léger S, LeRiche T, Li CS, Massé F, McKay DJ, Nicoll-Griffith DA, Oballa RM, Palmer JT, Percival MD, Riendeau D, Robichaud J, Rodan GA, Rodan SB, Seto C, Thérien M, Truong VL, Venuti MC, Wesolowski G, Young RN, Zamboni R, Black WC (2008) The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. *Bioorg Med Chem Lett* 18:923-928.
30. Beaulieu C, Isabel E, Fortier A, Massé F, Mellon C, Méthot N, Ndao M, Nicoll-Griffith D, Lee D, Park H, Black WC (2010) Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. *Bioorg Med Chem Lett* 20:7444-7449.
31. Urbina JA (2002) Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des* 8:287-95.

32. Urbina JA, Docampo R (2003) Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19:495-501.
33. Silva DT, de Nazareth S L de Meirelles M, Almeida D, Urbina JA, Pereira MC (2006) Cytoskeleton reassembly in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi* is triggered by treatment with ergosterol biosynthesis inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 27:530-537.
34. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, Romanha AJ (2003). Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents* 21:39-48.
35. Chen CK, Doyle PS, Yermalitskaya LV, Mackey ZB, Ang KK, McKerrow JH, Podust LM (2009). *Trypanosoma cruzi* CYP51 inhibitor derived from a *Mycobacterium tuberculosis* screen hit. *PLoS Negl Trop Dis* 3(2):e372.
36. Chen CK, Leung SS, Guilbert C, Jacobson MP, McKerrow JH, Podust LM (2010) Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e651.
37. Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T, Hiyoshi H. (2004). In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2379-2387.
38. Sealey-Cardona M, Cammerer S, Jones S, Ruiz-Pérez LM, Brun R, Gilbert IH, Urbina JA, González-Pacanowska D (2007) Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2123-2129.
39. Urbina JA, Concepcion JL, Montalvetti A, Rodriguez JB, Docampo R (2003) Mechanism of action of 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate (WC-9) against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2047-50.
40. Gerpe A, Odreman-Núñez I, Draper P, Boiani L, Urbina JA, González M, Cerecetto H (2007) Heteroallyl-containing 5-nitrofuranes as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents with a dual mechanism of action. *Bioorg Med Chem* 16:569-577.
41. Gerpe A, Alvarez G, Benítez D, Boiani L, Quiroga M, Hernández P, Sortino M, Zaccchino S, González M, Cerecetto H (2009) 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorg Med Chem* 17:7500-7509.
42. Gómez EB, Santori MI, Laría S, Engel JC, Swindle J, Eisen H, Szankasi P, Téllez-Iñón MT (2001) Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins. *Mol Biochem Parasitol* 113:97-108.
43. Knockaert M, Gray N, Damiens E, Chang YT, Grellier P, Grant K, Fergusson D, Mottram J, Soete M, Dubremetz JF, Le Roch K, Doerig C, Schultz P, Meijer L (2000) Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem Biol* 7:411-422.

CRUCIBIOQ

METABOLITOS SECUNDARIOS

Alexander Gutiérrez y Yolanda Saldaña Balmori
 Correo E: alexander.gutierrezm@gmail.com, balmori@laguna.fmedic. unam.mx



HORIZONTALES

1 Líquido viscoso, formado por resinas disueltas en aceites esenciales y procedentes de las plantas.

3 Quinonas *orto* tricíclicas derivadas del fenantreno y son utilizadas como colorantes.

6 Los metabolitos _____ son compuestos químicos sintetizados por los vegetales que no tienen un papel directo en el crecimiento o reproducción de los mismos, son de distribución restringida y se almacenan en el interior de las vacuolas.

- 7** Sustancias fenólicas fototóxicas cuya estructura química esta constituida por una cumarina fusionada a un anillo de furano.
- 11** Rama de la ciencia que utiliza los caracteres químicos de los metabolitos secundarios de un conjunto de organismos, para determinar su posición en una clasificación jerarquizada y evolutiva de los seres vivos.
- 13** Son S-glicósidos, también conocidos como tioglicósidos en los que la glicona es β -D-tioglucona y la aglicona es una oxima sulfatada, estas estructuras constituyen un mecanismo de defensa para las plantas al ser hidrolizados por la enzima tioglucosidasa (mirosinasa), que da lugar a glucosa, iones sulfato y uno de los siguientes derivados del aglucón: isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos u oxazolidintionas.
- 14** Ácido que representa el mayor reservorio de fósforo en las oleaginosas y cereales, a dosis moderadas en la dieta se puede unir a plomo y cadmio presente en el humano, lo que ayuda a su desintoxicación de estos elementos.
- 17** Quinona que participa en la cadena de transporte de electrones en las reacciones de fase luminosa de la fotosíntesis.
- 18** Grupo de monoterpenos (C_{10}) que presentan como esqueleto de carbono el 1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano, el cual se encuentra frecuentemente fusionado con un heterociclo de 6 elementos en donde uno de ellos es el oxígeno.
- 20** Son pigmentos tetraterpenoides con 40 átomos de carbono formados a partir de varias moléculas de isopentenil pirofosfato; se clasifican en carotenos que son hidrocarbonados y xantofilas que son sus derivados oxigenados.
- 22** Grupo de metabolitos no nitrogenados formados por la unión de unidades de acetato, cuya estructura química se caracteriza por presentar enlaces covalentes simples y triples alternados.
- 23** Los glucósidos _____ son metabolitos secundarios presentes en las semillas de algunos frutos, que liberan ácido cianhídrico como mecanismo de defensa.
- 25** Pigmentos naturales que tienen como característica estructural poseer dos grupos carbonilo en el anillo del naftaleno.
- 27** Compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en los vegetales conformados por 15 átomos de carbono, su estructura la constituyen 2 anillos de benceno denominados A y B, unidos por una estructura de 3 átomos de carbono que pueden o no formar un tercer anillo, el que recibe el nombre de anillo C, su esqueleto carbonado se representa por el sistema $C_6-C_3-C_6$.
- 28** Las mezclas de sustancias químicas que le confieren un aroma característico a determinadas plantas y que pueden separarse al ser destiladas por arrastre de vapor de agua, cuya condensación ofrece una fase muy bien definida respecto al agua, estas mezclas reciben el nombre de aceites _____.
- 30** Agliconas derivadas de la hidrólisis de las saponinas, pueden tener un esqueleto de tipo esteroide o triterpenoide.
- 32** Grupo de compuestos que provienen de la polimerización de isoprenos y son los principales responsables de las propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y terapéuticas que presentan los aceites esenciales.
- 33** Son triterpenoides de 26 átomos de carbonos a cuyo esqueleto hidrocarbonado le faltan 4 átomos de carbono en la parte de la cabeza de la última unidad de isopentenilo, se encuentran en las semillas de ciertos frutos cítricos, son sustancias de sabor amargo y algunos representantes de este grupo pueden ayudar a combatir el cáncer de boca y piel.
- 34** Derivados hidroxilados de los carotenos, se les llama también oxicarotenoides, en este grupo se encuentran la luteína y la zeaxantina; son los responsables del color amarillo de las hojas secas.
- 35** Fitonutrientes de pigmentación amarilla con propiedades antioxidantes, estructuralmente diferentes de los flavonoides debido a que están constituidos por dos anillos fenólicos unidos por un átomo de carbono ($C_6-C_1-C_6$), pero muy similares en sus reacciones de coloración y en su movilidad cromatografica.
- 36** Pigmentos rojos y amarillos que se encuentran en las plantas nitrogenadas, con las antocianinas son mutuamente excluyentes, es decir, si se encuentra este metabolito en una planta, estarán ausentes las antocianinas y viceversa.
- 37** Heteropolisacáridos que se encuentran en los vegetales como elementos estructurales del sistema celular de las plantas, proporcionan superficies cargadas que regulan el pH y el balance iónico; tienen como principal componente al ácido poligalacturónico.

VERTICALES

- 2 Se forman por migración de un anillo bencénico de la posición 2 a la 3 del anillo central de los flavonoides; están involucrados en los mecanismos de defensa y en la fijación de nitrógeno en las plantas
- 4 Derivados de los sesquiterpenos, son compuestos de 15 átomos de carbono, se forman a partir del ácido mevalónico mediante la unión cabeza-cola de las unidades de isopreno, incluyen en su esqueleto un anillo lactónico.
- 5 Familia de compuestos que se hallan ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal -en las plantas superiores se encuentran principalmente los llamados fitosteroles- su estructura consta de 27 a 29 átomos de carbono, tiene el núcleo anular del ciclopentano perhidrofenantreno, un grupo hidroxilo en el carbono 3 y grupos metilo en los carbonos 10 y 13.
- 8 Las agliconas _____ son derivados esteroides con un anillo lactónico insaturado, actúan sobre el músculo cardíaco y se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia de este órgano.
- 9 Sustancias muy solubles en agua, son parte de la familia de compuestos denominados flavonoides, además de ser las agliconas resultantes de la hidrólisis glicosídica de las antocianidinas.
- 10 Grupo de compuestos químicos no esteroides encontrados en las plantas, se les ha atribuido débiles propiedades estrogénicas, los más estudiados son las isoflavonas y los lignanos.
- 12 Es una quinona, tiene posición para, está presente en plantas como el ruibarbo y en el género *áloe*, tiene efectos laxantes y purgantes; se puede obtener a partir de la oxidación del antraceno.
- 14 Los compuestos producidos por plantas que no son nutrientes esenciales para la vida -por lo menos a corto plazo- pero que presentan actividad biológica, son denominados _____ y se clasifican en terpenos, fenoles, tioles, lignanos, tocoferoles y tocotrienoles.
- 15 Diketona del benceno, un isómero que está relacionado con la síntesis de la hidroquinona.
- 16 Sustancias de naturaleza proteica que se originan por el crecimiento y multiplicación de los hongos en un sustrato apropiado y que producen alteraciones en el metabolismo de otros organismos.
- 19 Son derivados polihidroxilados incoloros de la flavona, están presentes en el té verde; su estructura química es ligeramente diferente del resto de los flavonoides, pero comparten las mismas propiedades quimioprotectoras, antiinflamatorias y antioxidantes.
- 21 Constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de las plantas -biosintetizados generalmente a partir de aminoácidos- presentan gran diversidad estructural, generalmente tienen pH básico y presentan actividad farmacológica a bajas dosis.
- 24 Sustancias amargas derivadas del precursor triterpénico eufol, generalmente son δ -lactonas muy oxigenadas, tetra o pentacíclicas con muchos centros estereogénicos y se clasifican de acuerdo a su estructura química en 5 grupos C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{22} y C_{25} algunos son empleados como amebicidas y otros tienen propiedades antitumorales.
- 26 Compuestos carbonados en cuya estructura está el ciclopentano perhidrofenantreno el que está formado de la unión de cuatro anillos, tres hexagonales y uno pentagonal.
- 29 Compuestos de naturaleza fenólica originados por la condensación de unidades fenilpropánicas; actúan como antioxidantes en el metabolismo humano.
- 31 Sustancias resinosas solubles en agua, tienen un alto peso molecular y se forman mediante la destrucción de membranas celulares o bien de la exudación de las plantas.



LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA, A.C.

Con base en el Artículo Sexagésimo Séptimo
de sus estatutos vigentes

CONVOCA A TODOS LOS SOCIOS NUMERARIOS:

A presentar propuestas de candidaturas de socios numerarios para ocupar los puestos de Vicepresidente (uno), Subsecretario (uno) y Miembros de la Comisión de Admisión (cuatro) para el bienio 2011-2013. Las propuestas que realice la membresía deben hacerse llegar por escrito a la Mesa Directiva actual (bienio 2009-2011) y estar firmadas (de puño y letra), acompañadas de un breve resumen curricular del candidato propuesto (una cuartilla) y de un escrito donde éste exprese su aceptación a participar en las elecciones. La propuesta o propuestas podrán ser enviadas desde un correo electrónico registrado en el directorio actualizado de la SMB o bien:

Enviar las propuestas por correo o mensajería a:

Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.
Atención: Sra. Guadalupe Ramírez
Oficina SMB en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Apdo. Postal 70-600
04510 México D.F.

O por correo electrónico a: infosmb@ifc.unam.mx

La recepción de propuestas se cerrará durante la Asamblea General Ordinaria convocada para el día 7 de junio de 2011 a las 17:00 hrs en el Auditorio del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

La convocatoria completa puede ser consultada en el portal de la SMB en la siguiente dirección:
<http://www.smb.org.mx>

Atentamente
Mesa Directiva 2009-2011



II Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias

7 al 11 de noviembre de 2011, Huatusco, Veracruz, México

Comité Organizador

Guadalupe Espin

espin@ibt.unam.mx

Dimitris Georgellis

dimitris@ifc.unam.mx

Agustino Martínez

amartinez@ira.cinvestav.mx

Christian Sohlenkamp

chsohlen@ccg.unam.mx

Cupo limitado

Fecha límite de entrega de
resúmenes: 15 de junio

Conferencistas Invitados:

Dr. Susan Gottesmann

Center for Cancer Research
Maryland, USA

Dr. Peter Greenberg

University of Washington
Seattle, USA

Dr. Roberto Kolter

Harvard Medical School
Boston, USA

Dr. Jeff F. Miller

UCLA, Los Angeles, USA

Dr. Christian Raetz

Duke Medical School
Carolina del Norte, USA

Informes e inscripciones:

biol_mol_bac@yahoo.com.mx

<http://smb.org.mx/>





Small Meeting on Yeast Transport and Energetics 5-9 September, 2011 Mérida, Yucatán, MEXICO

Topics

- Targeting and regulation of receptors, pumps and transporters
- Structure, function and regulation of transporters
- Transporters and Biotechnology
- Intracellular trafficking
- Transport and energetics in non conventional yeasts
- Orthologs of yeast transporters in human diseases.
- Metabolic and energy regulation
- Transporters and cell/organelle morphology
- Transport response to stress and environmental sensing
- Transport and detoxification of ion and organic compounds in fungi and cancer cells

Organizing Committee

Antonio Peña

Martha Calahorra

Norma Silvia Sánchez

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Important Dates:

APRIL

April 15th: Registration and Abstract submission open

JUNE

June 15th: Deadline for registration and Abstract submission

JULY

July 15th: you will receive an e-mail with the detailed information about your registration and presentation at the meeting

Contact:

phone: (+5255) 5622-5742 **fax:** (+5255)5616-2282

personal-service hours: 10:00h-14:00

smyte29@ifc.unam.mx

More information

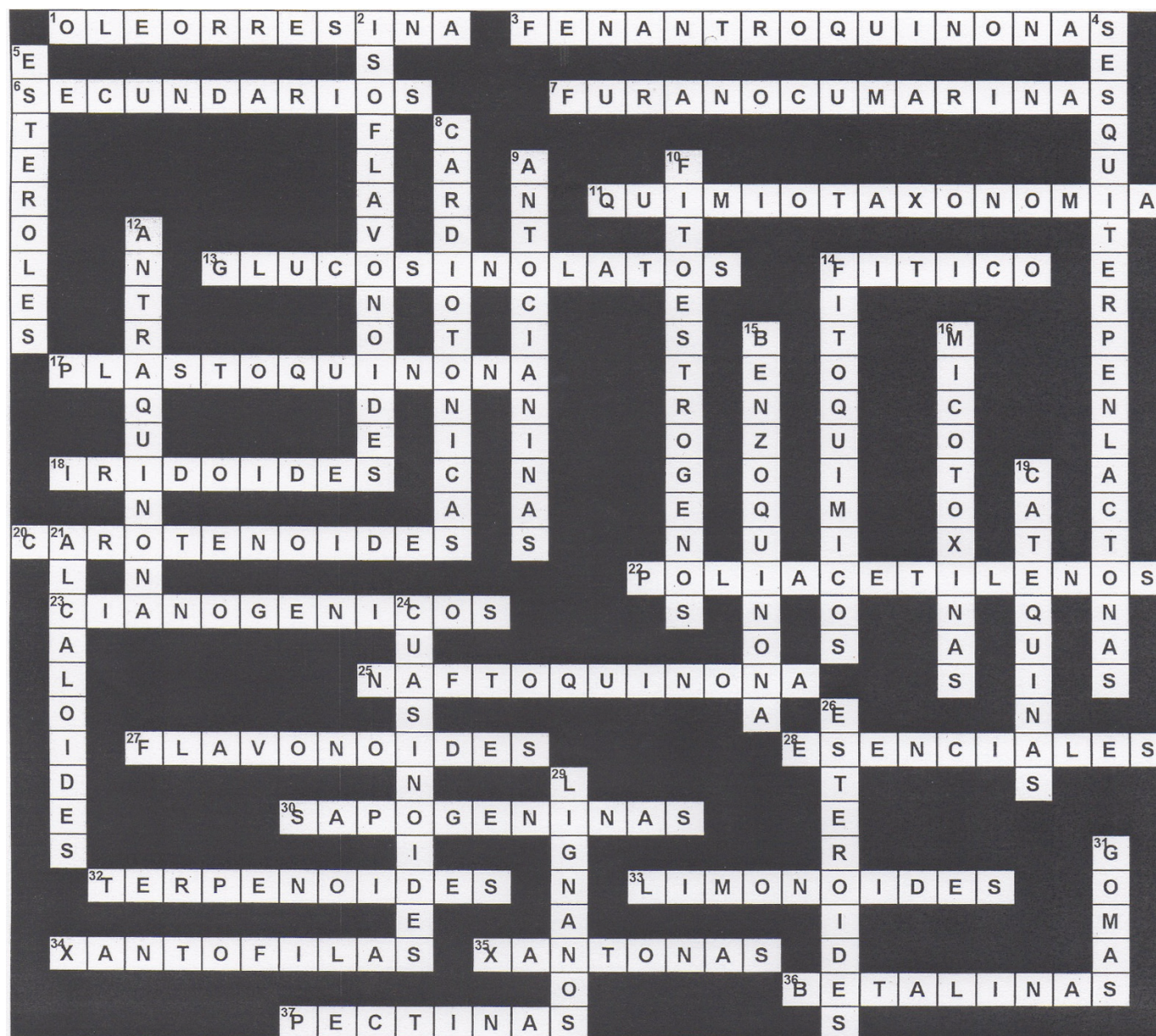
<http://www.ifc.unam.mx/smyte29/>



Imágenes: © Celso Flores, exfordy

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ METABOLITOS SECUNDARIOS

Alexander Gutiérrez y Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: alexander.gutierrezm@gmail.com, balmori@laguna.fmedic. unam.mx



**Rama de Bioenergética y Biomembranas
Sociedad Mexicana de Bioquímica
XVII Reunión**



**Hotel "Los Cocuyos" Huatusco, Veracruz
noviembre 13-18, 2011**

**www.smb.org.mx
[informes: smbq@ifc.unam.mx](mailto:informes:smbq@ifc.unam.mx)**

XIV CONGRESO NACIONAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS Y 7TH SYMPOSIUM MEXICO - USA

29 Noviembre al 2 Diciembre 2011
Centro de Convenciones Campeche XXI

- Developmental processes
- Responses to environment
- Plant-microbe and insect interactions
- Plant nutrition
- Secondary metabolism
- Signaling and Gene regulation
- Genomics, Proteomics and Metabolomics
- Epigenetics
- Molecular and Genome evolution
- Molecular Systematics and Biodiversity
- Applied Biotechnology
- Association mapping and Crop improvement



<http://www.smb.org.mx/>

<http://www.congresoscipe.com/web/2011/smb-plantas>



Cell Signaling Networks 2011



**13th IUBMB Conference, 1st PABMB Conference & 3rd Meetings of the
Signal Transduction & Oxidative Stress Branches of SMB
Mérida, Yucatán, México. October 22nd-27th, 2011**

Organizers:

Fernando López-Casillas, Mexico City,
José Vázquez-Prado, Mexico City,
and Teresa Hernández-Sotomayor, Mérida

Conference topics:

Signal Transduction and Redox Biology
in Cancer, Development, Immune System,
Metabolism, Stem Cells, Gene Expression,
Ageing, Nutrition, Angiogenesis, Plant and
Microorganisms Biology.

Symposia will include, among others, Imaging,
Structural Basis of Signaling, Informatics, RNA
Silencing, Systems Biology, Optogenetics and
Brain Circuitry, Host-Pathogen Interactions,
Protein Phosphorylation and Other
Posttranslational Modifications, Signaling and
Proteases, Oxidative Stress and Disease, Plant
Signaling and Response to Stress.

**THE JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY**



CSN2011 has been distinguished
as one of the meetings granting
the prestigious Herbert Tabor
Young Investigator Award

Confirmed speakers:

Jesus Aguirre, Mexico City
Neal M. Alto, Dallas
Mario Arteaga-Vázquez, Xalapa
Liliana Attisano, Toronto
Angelo Azzi, Boston
Tamás Balla, Bethesda
Philippe Bastiaens, Dortmund
Vilhelm A. Bohr, Baltimore
Judith S. Bond, Hershey, PA
Wendy Boss, Raleigh, NC
Rod Bremner, Toronto
Jerold Chun, San Diego
Carmen Clapp, Querétaro
Luis Covarrubias, Cuernavaca
Roger Davis, Worcester
Miguel A. de la Rosa, Sevilla
Luis de Lecea, Stanford
Gabriel del Río, Mexico City
Diana Escalante, Mexico City
Manel Esteller, Barcelona
Larry A. Feig, Boston
Richard A. Flavell, New Haven
Bertrand Friguet, Paris
Shigetomo Fukuhara, Osaka
Adolfo García-Sáinz, Mexico City

Marina Gavilanes, Mexico City
Stathis Gonos, Athens
Claudia González-Espinosa, Mexico City
Joan J. Guinovart, Barcelona
Ranier Gutiérrez, Mexico City
J. Silvio Gutkind, Bethesda
Heidi Hamm, Nashville
Gerald Hart, Baltimore
Akiko Hata, Boston
Alfredo Herrera-Estrella, Irapuato
Elena Hidalgo, Barcelona
Andrew Hinck, San Antonio
Marcia Hiriart, Mexico City
Gökhan S. Hotamisligil, Boston
Stevan Hubbard, New York
Tony Hunter, San Diego
Harry Ischiropoulos, Philadelphia
Edda Klipp, Berlin
Mina Konigsberg, Mexico City
Young-Guen Kwon, Seoul
Sergio Lavandero, Santiago
Mark A. Lemmon, Philadelphia
John Leong, Worcester
Judy Lieberman, Boston

Mary Kay Lobo, New York
Scott Lowe, Cold Spring Harbor
Marcos Malumbres, Madrid
Joan Massagué, New York
Michiyuki Matsuda, Kyoto
Federico Mayor Jr., Madrid
Helen McNeill, Toronto
Simin Nikbin Meydani, Boston
Mohsen Meydani, Boston
Shaday Michán, Mexico City
Stephen Michnick, Montreal
Naoki Mochizuki, Osaka
Moosa Mohammadi, New York
Randall T. Moon, Seattle
Julio Moran, Mexico City
Teun Munnik, Amsterdam
Fernando Navarro-García, Mexico City
Angela Nieto, Alicante
Tony Pawson, Toronto
Francesc Posas, Barcelona
Rafael Radi, Montevideo
Juan Riesgo, Querétaro
Juan Rivera, Bethesda
Yvonne Rosenstein, Cuernavaca

Homero Rubbo, Montevideo
Guy Salvesen, San Diego
Francisco Schopfer, Pittsburgh
Robert Screaton, Ottawa
Vanessa Sperandio, Dallas
Sarah Spiegel, Richmond
M. Sharon Stack, Notre Dame
Peter Storz, Jacksonville
Susan S. Taylor, San Diego
George Thomas, Cincinnati
Gabor J. Tigyi, Memphis
Jesus Torres-Vazquez, New York
Armando Tovar, Mexico City
Sin Urban, Baltimore
Luis Vaca, Mexico City
Mahara Valverde, Mexico City
Holly Van Remmen, San Antonio
André Veillette, Montreal
Lício A. Velloso, Campinas
Jeff Wrana, Toronto
Hao Wu, New York
Feng Zhang, Cambridge, MA
Antonio Zorzano, Barcelona

Sponsored by:



Pre-Conference Course :

From Protein Interactions to Epigenetic Regulation: New Frontiers in Signal Transduction.
October 20-22, 2011. Mérida, Yucatán. Organized by Claudia Gonzalez-Espinosa and Yvonne Rosenstein.
e-mail: precongreso.merida.2011@gmail.com

www.csn2011.com
email: merida2011@ifc.unam.mx

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

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

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

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

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

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

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

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

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

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

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

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

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

II) OTRAS COMUNICACIONES

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

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

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