



ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

ANALES 2016

SUMARIO

MEMORIA	3
160º ANIVERSARIO	18
Palabras Del Presidente Academico Dr. Manuel Limeres	18
“Epidemiología y control de enfermedades transmitidas por Aedes Aegypti. Conocimiento versus Aplicaciones.”	20
Conferencia del Acad. Correspondiente Dr. Guillermo Lossa	
160º JORNADA CIENTIFICA	31
“Nuevas Estrategias en Ecotoxicología y Toxicogenómica”	33
Presentación del Academico Dr. Alfredo Salibian	
I-¿Un Claro En El Arduo Camino Utópico Hacia La “Huella Digital” Del Impacto?.....	
Prof. Dr. Andrés Venturino	38
II-“La Era “Ómica” En Especies No Modelo. Análisis Transcriptómico Para El Desarrollo De Biomarcadores”.	
Prof. Dr. Danilo Ceschin.....	39
III-“Identification Of Molecular Biomarkers Of Exposure To Contaminants In Aquatic Organisms”	
Prof. Dr. Afonso CD Bainy.	41
IV-“Importancia De Las Relaciones Jerarquicas En La Interpretacion De Datos Ecotoxicologicos”.	
Prof. Dra. Alicia E. Ronco.	42
PRESENTACION JOVENES INVESTIGADORES	43
PREMIOS 2016	46
PREMIO MARENZI “El Aluminio Inhibe A Las Ca²⁺-Atpasas De Membrana Plasmática Y De Retículo Sarcoplasmático Por Mecanismos Diferentes”	
Marilina de Sautu, Nicolás Saffioti, Mariela Ferreira Gomes e Irene Mangialavori...	47
PREMIO BANDONI “Estafietina y derivados semisintéticos: evaluación de sus efectos sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>, <i>Leishmania</i> sp. y células de melanoma”	
Valeria P. Sülsen, Emilio Lizarraga, Silvia I. Cazorla, Augusto E. Bivona, NatachaCerny, Renzo Martino, Cesar Atilio N. Catalan	107
MENCION PREMIO M.A.ENERO “Estudio De Unión De Un Ligando Con Propiedades Alos Téricas Para El Receptor Nicotínico”	
Carlos Humberto Paván	129

CONSEJO DIRECTIVO

ASUNCIÓN DE NUEVAS AUTORIDADES

El 28 de abril tuvo lugar la Asamblea Ordinaria convocada para proceder a la elección de los miembros que cesan su mandato, siendo elegidos por un período de dos años: Presidente, Secretario, Tesorero, un Vocal Titular y un Vocal Suplente y por un año: tres Revisores de Cuentas.

El Consejo Directivo quedó constituido de la siguiente manera:

Presidente:	Acad. Dr. Manuel R. Limeres
Vicepresidente:	Acad. Dr. Carlos M. Baratti
Secretario General:	Acad. Dr. Horacio José Gabriel Mato
Prosecretario:	Acad. Dr. Nestor Caffini
Tesorero:	Acad. Dr. Alfredo Salibian
Protesorero:	Acad. Dr. Miguel D' Aquino
Vocales Titulares:	Acad. Dr. Carlos A. Gotelli Acad. Dr. Juan Pablo F.C. Rossi
Vocales Suplentes:	Acad. Dra. Marta M. Salseduc Acad. Dr. Miguel Ángel Caso
Revisores de Cuentas:	Acad. Dra. Virginia Martino Acad. Dr. Osvaldo Cascone Acad. Dr. Francisco Stéfano

El Consejo Directivo realizó durante este período diez (10) reuniones y el Claustro Académico se reunió en nueve (9) oportunidades. La nómina de las Comisiones y la composición de las Secciones figuran como anexos I y II.

NUEVOS ACADEMICOS

ACTOS DE INCORPORACION DE ACADEMICOS

ACADEMICO TITULAR

El 25 de agosto el claustro aprobó la postulación del Acad. Correspondiente Dr. Alberto Díaz como Académico Titular.

El 24 de noviembre el claustro votó la incorporación de la Dra. Norma Sterin de Speziale como Académica titular y de la Dra. Silvia Gold y a la Dra. María Luz Martínez como Académicas correspondientes.

La Dra. Speziale asumirá el 23 de marzo de 2017, la Dra. Silvia Gold 27 de abril de 2017 y la Dra. Martínez el 18 de mayo de 2017.

ACADEMICOS EMERITOS

El 28 de Abril, el Acad. Dr. Baratti dio lectura a la fundamentación de la propuesta del Dr. Modesto Rubio como Académico Emérito, recordando que ingresó a la entonces Academia Argentina de Farmacia y Bioquímica en 1996 y que se desempeñó durante dos períodos (2006 al 2008 y 2008 al 2010) como Presidente de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Sometida a votación, la propuesta resulta aprobada por unanimidad de los 29 Académicos presentes.

COLOQUIOS

23-6-2016 se realizó el coloquio del Dr. Carlos Damin, Profesor Titular de Toxicología de la Facultad de Medicina de la UBA y Jefe de Toxicología del Hospital de Agudos Juan A. Fernández, quien disertó sobre los hechos ocurridos recientemente en Costa Salguero, siendo su exposición seguida de numerosas consultas.

28-7-2016 Coloquio Dr. Coco “Fecundación in vitro en seres humanos”

CONFERENCIA

28-9-2016 se dictó la Conferencia de la Farmacéutica Isabel Reinoso, presidente del CFPBA “El modelo de Farmacia: de la dispensa a los Servicios Farmacéuticos”

27-10-2016 el Acad. Correspondiente en Alemania Dr. Pablo Steimberg, de visita en Buenos Aires, disertó sobre el tema “Molecular mechanisms of colon carcinogenesis induced by food contaminants”

PROYECTO DE LEY 0324 D - 2016

El 8 de Junio de 2016, la Honorable Cámara de Senadores de la Nación aprobó el dictamen de su Comisión de Presupuesto y Hacienda, incorporando a la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica en el presupuesto destinado a las Academias Nacionales.

El 12 de julio fue publicada en el Boletín Oficial la Ley 27254, que había quedado promulgada de hecho el 5 de julio y que modifica el artículo 2° de la ley 24.824, que queda redactado de la siguiente manera *“Artículo 2°: La Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica percibirá las contribuciones y subsidios previstos a favor de las Academias Nacionales por el artículo 4° del decreto ley 4.362/55, complementado por el decreto 1.556/2008”*.

Queda concretado un esfuerzo de gestiones iniciadas a partir de 2002 durante la presidencia del Acad. Dr. Sanahuja y continuada luego a través de las presidencias de los Académicos Dr. Rubio y Dr. Baratti.

El 15 de julio, el Acad. Dr. Limeres, Acad. Dr. Mato y el Acad. Dr. Rossi sostuvieron una audiencia en relación al tema con el Dr. Sergio Daniel Matheos, Subsecretario de Coordinación Institucional del Ministerio de Ciencia y Tecnología e Innovación Productiva.

A partir de esta fecha se han realizado las tareas de inscripción y presentación de documentación destinadas a tramitar las contribuciones y subsidios previstos en 4° del decreto ley 4.362/55, complementado por el decreto 1.556/2008 que fueron presentados en el MINCYT el 1/11/2016.

El 26 de septiembre el Académico Limeres conjuntamente con los Acads. Baratti y Mato estuvieron reunidos con el Subsecretario de Coordinación Institucional del MINCYT, Dr. Sergio Daniel Matheos. Manifiesta que la reunión fue muy cordial y que recibieron sugerencias sobre la presentación de la nota por parte de la Academia en relación a la situación actual y a las necesidades presupuestarias. El Dr. Matheos les informó que es intención del Dr. Lino Barañao solicitar la adjudicación de un nuevo edificio para albergar a cuatro Academias Nacionales, que podría incluir a la ANFYB. En el mes de diciembre Los Acad. Limeres y Mato se reunieron con el Lic. Agustín Campero y el Dr. Sergio Matheos.

160º ANIVERSARIO

El 10 de agosto de 2016, a las 18 horas, en la Sala de conferencias “Pbro. Antonio Sáenz” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA Junín 956 PP Ciudad Autónoma de Buenos Aires, se celebró la Sesión Pública Extraordinaria con motivo de celebrar el 160º aniversario de su creación.

Presidió EL ACTO el Acad. Dr. Manuel R. Limeres que pronunció las palabras de bienvenida. (Anexo V)

En el acto se entregó el diploma de Acad. Dr. Emérito al Dr. Modesto C. Rubio.

El Acad. Dr. Miguel D’Aquino presentó al Acad. Correspondiente Dr. Guillermo Lossa disertó sobre “Epidemiología y control de enfermedades transmitidas por Aedes Aegypti. Conocimiento versus Aplicaciones.” (Anexo V)

En el mismo acto se entregaron al Premio Trienal Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica a la ANMAT y los Premios Academia 2014: Premios Rebeca Gershman y Ricardo A. Margni 2014

160° JORNADA CIENTIFICA

El 1/9/2016 se realizó, en la Sala de conferencias “Pbro. Antonio Sáenz de la Facultad De Farmacia Y Bioquímica-UBA, la 160ª Jornada Científica sobre “NUEVAS ESTRATEGIAS EN ECOTOXICOLOGIA Y TOXICOGENOMICA Aportes teóricos y experimentales de la Bioquímica”.

Durante las sesiones coordinadas por los Acad. Dr. Juan Pablo Rossi y Acad. Dr. Alfredo Salibian se desarrolló el siguiente programa:

10.00 – 10.10	Bienvenida. Presidente de la Academia Dr. Manuel R. Limeres.
10.15 – 10.45	Introducción. Acad. Dr. Alfredo Salibian.
10.45 – 11.30	“Un claro en el arduo camino utópico hacia la “huella digital” del impacto.” Prof. Dr. Andrés Venturino (CITAAC - UN Comahue - CONICET).
11.30 – 11.45	Café.
11.45 – 13.00	Exposiciones de investigadores jóvenes: Dra. Lascano C.I., Dra. Bernal-Rey D., Dra. Dopchiz L.P.
13.00 – 14.00	Receso para almuerzo.
14.00 – 14.45	“La era <i>ómica</i> en especies no modelos. Análisis transcriptómico para el desarrollo de biomarcadores.” Prof. Dr. Danilo Ceschin (CITAAC - UN Comahue - CONICET).
14.45 – 15.30	“Identificación de biomarcadores moleculares de exposición en organismos acuáticos.” Prof. Dr. Afonso C. Dias Bainy (Univ. Federal de Florianópolis-Brasil).
15.30 – 15.40	Café.
15.40 – 16.25	“Importancia de las relaciones jerárquicas en la interpretación de datos ecotoxicológicos.” Prof. Dra. Alicia E. Ronco (CIMA – UNLP - CONICET).
16.30 – 17.00	Exposiciones de investigadores jóvenes: Dra. Eissa B.L., Dra. Ossana N.A.
17.00 – 17.40	Mesa Redonda: expositores y asistentes.
17.40 – 17.50	Clausura.

PREMIOS

PREMIOS 2016

Premio Agustín Marenzi al trabajo “El aluminio inhibe a las Ca^{2+} ATPasas de membrana plasmática y de retículo sarcoplásmico por mecanismos diferentes” presentado por Marilina de Sautu, Nicolás Saffioti, Mariela Ferreira Gomes e Irene Mangialavori.

Premio Alfredo Bandoni al trabajo “Estafietina y derivados semisintéticos: evaluación de sus efectos sobre *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp. y células de melanoma”, presentado por Valeria P. Sülsen, Emilio Lizarraga, Silvia I. Cazorla, Augusto E. Bivona, Natacha Cerny, Renzo Martino y César A. N. Catalán.

Asimismo resolvió adjudicar una Mención al Premio María A. Enero al trabajo “Estudio de unión de un ligando con propiedades alostéricas para el receptor nicotínico”, presentado por Carlos H. Paván. Se declara desierto el Premio Francisco Cignoli.

REVISTA ACADEMIA

En el mes de julio la Acad. Dra. Marta Salseduc confirma que se ha finalizado la revisión y corrección del material digitalizado correspondiente a toda la colección de Revista Farmacéutica desde sus orígenes, tarea que se iniciara conjuntamente con el Acad. Dr. Rubio.

La información comprende 1250 números y 37482 archivos. El material está en formato PDF y supera los 36 Gb, que se dispondrán en CDs.

Se analiza la conveniencia de que el material, además de ser incorporado al sitio web de la Academia, sea enviado al MINCYT y a repositorios que existen ya en algunas universidades.

La CD decide entregar a la Fundación Barón copia de los mismos en un cofre de madera *ad hoc* que contenga el emblema de la Academia.

AUSPICIOS DE LA ACADEMIA A REUNIONES CIENTÍFICAS

En mayo Confederación Farmacéutica Argentina (COFA) en la que solicita el auspicio de la Academia para la realización del XXII Congreso Farmacéutico Argentino que se realizará entre el 28 y 30 de agosto del corriente año. Se decide otorgar el auspicio y se propone que se solicite a la COFA autorización para adjuntar un pequeño folleto que dé cuenta de las actividades de la Academia en el sobre que se entrega a los participantes, incluido el anuncio de la realización de las Jornadas sobre Ecotoxicología.

RELACIONES CON OTRAS ACADEMIAS NACIONALES

04-EI 14-4-2017 Acad. Dr. Limeres asistió a la asunción de las nuevas autoridades de la Academia Nacional de Medicina

05-EI 19/5/2016 los Acad. Dres. Caso y Squassini asistieron a la sesión pública de la Academia Nacional de Medicina en la que se incorporó como miembro el Dr. Gonzalo Recondo

05-EI 16/5/2016 el Acad. Dr. Manuel Limeres asistió al acto conjunto en homenaje al Congreso de Tucumán que realizó la Academia Nacional de la Historia

05-EI 10/5/2016 los Acad. Dres. Caso y Squassini asistieron a la sesión pública convocada por la Academia Nacional de la Historia con motivo de la asunción del Académico correspondiente Dr. Alfredo Poenitz.

06-EI 7-6-2016 los Acad. Dres. Limeres y Caso asistieron a la celebración del Día del Periodista organizado por la Academia Nacional de Periodismo en la que se entregó el premio Pluma de Oro al Doctor Natalio Botana

08-Los Acad. Dres. Caso y Squassini asistieron a la conmemoración del 204° aniversario del Éxodo Jujeño realizado el 23/8/2016 en el Salón Saavedra del Regimiento de Infantería 1 "Patricios.

09-EI Acad. Dr. Caso asistió el 29/9/2016 a la Sesión Pública Extraordinaria de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria en la que se incorporó como Académico de número el Dr. Olindo Martino.

10-EI Acad. Dr. Limeres concurrió al Quinto Encuentro interacadémico realizado el 13/10 en la sede de la Academia Nacional de Medicina donde se presentó el libro "El problema ambiental en la sociedad, la salud y la economía"

11-EI Acad. Dr. Limeres asistió el 8/11/2017 a la sesión pública extraordinaria la Académica Nacional de Ciencias Morales y Políticas de incorporación del Académico de Número Dr. Ricardo López Murphy.

COLABORACION

El Acad. Dr. D´Aquino muestra un ejemplar del opúsculo de su autoría "El saneamiento al alcance de todos", decidiéndose remitirlo a la Comisión de Publicaciones para que proceda a su análisis y revisión. El mismo será publicado por la Academia y distribuido en bibliotecas y escuelas.

RELACIONES CON OTRAS INSTITUCIONES Y PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

23/6/2016 Acad. Dr. Limeres informa que concurrió a la Subsecretaría de Políticas, Regulación y Fiscalización del Ministerio de Salud, en calidad de representante ante la Comisión Nacional de Profesionales de Grado de la Salud, creada en el año 2006 y que se halla coordinada operativamente por la Dirección Nacional de Regulación Sanitaria y Calidad de Servicios de la Salud. El objetivo de la reunión fue presentar ante la Comisión las nuevas autoridades del Ministerio, fijar las perspectivas de trabajo para 2016/2020 y actualizar los miembros de las distintas Subcomisiones.

En setiembre el Acad. Dr. Limeres concurrió a la Convocatoria a todas las academias realizada por la Diputada Presidenta Sandra Daniela Castro, la diputada presidenta segunda Miriam Graciela Gallardo y el diputado Alejandro Etchegaray, viceprimero de la Comisión de Ciencia, tecnología y innovación productiva. Tema: Presupuesto del Mincyt.

En el mes de Abril el presidente concurrió a la inauguración del nuevo edificio de CAEME

El presidente asistió a las reuniones de fin de año de CAPEMVEL, CILFA y COFA

Expresiones de la Academia Nacional de Medicina en relación a la protesta farmacéutica en el marco del Proyecto de Ley que propone modificaciones a la Ley 25649

Como consecuencia de la presentación de un proyecto de modificación a la Ley 25649, proponiendo que en las recetas se evite recomendar marcas comerciales de medicamentos, la Academia Nacional de Medicina habría expresado como parte de la argumentación en contra de la propuesta de modificación "que la farmacia es atendida habitualmente por personal no profesional". Ello provocó una respuesta de la Sección de Farmacéuticos del Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal a través de las redes sociales, así como una nota del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires dirigida al Presidente de la Academia Nacional de Medicina. Luego de un intenso intercambio de opiniones, se decide elevar una nota a la Academia Nacional de Medicina, que en su parte final manifiesta "que lo expresado por esa Academia constituye una discriminación hacia todos los farmacéuticos argentinos y por ende un agravio" y que en consecuencia "se espera un desagravio de esa prestigiosa entidad".

PUBLICACIONES

Revista Farmacéutica 158nº 1 (2016 versión electrónica.

Anales de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica (Año 2015) versión electrónica.

ACTO DE FIN DE AÑO

El 6 de diciembre tuvo lugar, en la sede de nuestra Academia, el brindis de Fin de Año.

ENTIDADES COOPERADORAS DE LA ACADEMIA

Entidades Cooperadoras que apoyan económicamente a la Academia, permitiendo así su normal funcionamiento.

Laboratorios **ROEMMERS S.A.**

Laboratorios **BAGO SA**

COLEGIO OFICIAL DE FARMACEUTICOSY BIOQUIMICOS DE CAPITAL FEDERAL

CONFEDERACION FARMACEUTICA ARGENTINA (COFA)

CAMARA ARGENTINA DE ESPECIALIDADES MEDICINALES (CAEME)

COLEGIO DE FARMACEUTICOS DE LA PCIA. DE BUENOS AIRES

CILFA

ANEXO I

COMISIONES 2016

(Por orden alfabético)

• REUNIONES CIENTÍFICAS, CURSOS Y CONFERENCIAS

Acad. Carlos M. Baratti (Coordinador), Acad. Maria C. Añon, Acad. Alberto Diaz, Acad. Silvia Hajos, Acad. Manuel R. Limeres, Acad. Marcelo Nacucchio, Acad. Edgardo Poskus.

• PUBLICACIONES, BIBLIOTECA Y CANJE

Acad. Dr. Nestor Caffini (Coordinador), Acad. Alberto Gurni (Coordinador Alterno), Acad. Gabriel Gutkind, Acad. Silvia Hajos, Acad. Virginia Martino, Acad. Marcelo C. Nacucchio, Acad. María Luz Pita Martín.

• VINCULACIONES Y RELACIONES PÚBLICAS

Acad. Miguel A. Caso (Coordinador), Acad. Mirta Biscoglio, Acad. Miguel D´Aquino, Acad. Carlos Gotelli, Acad. Manuel R. Limeres y Acad. Marcelo Squassini.

• EDUCACIÓN FARMACÉUTICA Y BIOQUÍMICA Y ÉTICA

Acad. Maria C. Añon, Acad. Alberto Boveris, Acad. Nestor Caffini, Acad. Ricardo Caro, Acad. Tomás Di Paoli, Acad. Carlos Gaozza, Acad. Regina Wikinski (Coordinadora).

• PREMIOS Y DISTINCIONES

Acad. Osvaldo Cascone (Coordinador), Acad. Clyde N. Carducci, Acad. Roberto Coco, Acad. Mario Los, Acad. Virginia Martino, Acad. Alfredo Salibián, Acad. Francisco Stefano.

• ESTATUTO Y REGLAMENTO

Acad. Gabriel Mato (Coordinador), Acad. Carlos Gotelli Acad. Juan Pablo Rossi y Acad. Marta Salseduc.

ANEXO II

MIEMBROS

ACADÉMICOS TITULARES

Acad. Dra. María Cristina Añón
Acad. Dr. Carlos M. Baratti
Acad. Dra. Mirta J. Biscoglio
Acad. Dr. Alberto A. Boveris
Acad. Dr. Nestor O. Caffini
Acad. Dr. Clyde N. Carducci
Acad. Dr. Ricardo A. Caro
Acad. Dr. Osvaldo Cascone
Acad. Dr. Miguel A. Caso
Acad. Dr. Roberto Coco
Acad. Dr. Miguel D' Aquino
Acad. Dr. Alberto Diaz
Acad. Dr. Tomás de Paoli
Acad. Dr. Carlos H. Gaozza
Acad. Dr. Hector I. Giuliani
Acad. Dr. Gabriel O. Gutkind
Acad. Dr. Alberto Gurni
Acad. Dr. Carlos A. Gotelli
Acad. Dr. Alfredo A. Hager
Acad. Dra. Silvia Hajos
Acad. Dr. Manuel Limeres
Acad. Dr. Mario A. Los
Acad. Dra. Virginia Martino
Acad. Dr. Horacio José Gabriel Mato
Acad. Dr. Marcelo C. Nacucchio
Acad. Dra. María Luz Pita Martín de Portela
Acad. Dr. Marco Pizzolato
Acad. Dr. Edgardo Poskus
Acad. Dr. Otmaro E. Roses
Acad. Dr. Juan Pablo F.C. Rossi
Acad. Dr. Alfredo Salibian
Acad. Dra. Marta M. Salseduc
Acad. Dr. Francisco J.E. Stefano
Acad. Dra. María Guillermina Volonté
Acad. Dra. Regina L. W. de Wikinski

ANEXO II

ACADEMICOS CORRESPONDIENTES

ARGENTINA

Acad. Dr. Carlos Bregni
Acad. Dr. Marcelo O. Cabada
Acad. Jorge Errecalde
Acad. Dr. Oscar H. Fay
Acad. Dr. Raul C. Fazio
Acad. Dr. Guillermo R. Lossa
Acad. Dr. Ruben H. Manzo
Acad. Dr. Aldo D. Mottino
Acad. Dra. Elsa M. Nadalin
Acad. Dr. Jorge O. Nicolini
Acad. Dr. Otto A. Orsingher
Acad. Dra. Ana Maria Pechen D'Angelo
Acad. Dra. Gabriela Del Valle Perdigón
Acad. Dra. Clelia M. Riera
Acad. Dr. Daniel O. Sordelli
Acad. Dr. Marcelo D. Squassini

ALEMANIA

Acad. Dr. Pablo Steinberg

BRASIL

Acad. Dr. Aluísio Pimenta
Acad. Dr. Caio Romero Cavalcanti

CHILE

Acad. Dr. Aquiles Arancibia Orrego
Acad. Dr. Marco A. Montes Guyot
Acad. Dr. Rosa I. Morán Gana
Acad. Dra. Wanda Quilhot Palma

COLOMBIA

Acad. Dr. Fleming Martíne Rodríguez

CUBA

Acad. Dr. Ricardo Galvis
Acad. Dr. Héctor Zayas Bazan Y Perdomo

ECUADOR

Acad. Dr. Julio F. Araoz
Acad. Dr. Eduardo Goetchel

ANEXO II

ACADEMICOSCORRESPONDIENTES

ESPAÑA

Acad. Dr. María del Carmen FrancésCausapé

Acad. Dr. Tomás Adzet Porredón

Acad. Dr. Francisco Zaragoza García

Acad. Dr. Eduardo Mariño Hernández

Acad. Dr. Miguel Ylla Catalá Genis

Acad. Dr. Antonio Monge Vega

ESTADOS UNIDOS

Acad. Dr. Jorge R. Barrio

Acad. Dr. Jorge D. Brioini

Acad. Dr. Marcel E. Nimni

FRANCIA

Acad. Dr. Jean Marc Aïache

Acad. Dr. Paul Fleury

Acad. Dr. Carlos Soto

ITALIA

Acad. Dr. Stefano Govoni

MEXICO

Acad. Dr. Pedro Joseph Nathan

PANAMA

Acad. Dr. Ceferino Sánchez

PARAGUAY

Acad. Dr. Luis H. Berganza

PERU

Acad. Dr. Fernando Quevedo Ganoza

Acad. Dr. José Amiel Pérez

VENEZUELA

Acad. Dr. José Luis Andrade

URUGUAY

Acad. Dr. Jorge Ares Pons

Acad. Dr. Cayetano Cano Marotta

Acad. Dr. Cosme de los Santos Carvallido

Acad. Dr. Uberfil Delbene Garate

Acad. Dr. Pietro Fagiolino

Acad. Dra. Raquel Lombardo de Bertolaza

Acad. Dr. Justo Emilio Menes

Acad. Dr. Patrick Moyna

Acad. Dr. Anibal Alberto Olmos Ferreira

Acad. Dr. Oscar Polla Bermudez

Acad. Dr. Joaquin E. Royer Meicoso

ANEXO II

ACADEMICOS EMERITOS

Acad. Dr. Sem M. Albonico
Acad. Dr. Arnaldo L. Bandoni
Acad. Dr. Rodolfo Brenner
Acad. Dr. Mateo Chekherdemian
Acad. Dr. Ronaldo Meda
Acad. Dr. Modesto C. Rubio

ACADEMICOS HONORARIOS

ARGENTINA

Acad. Dr. Juan Carlos Bagó

BRASIL

Acad. Dr. Evaldo De Oliveira

ESPAÑA

Acad. Dr. Benito del Castillo García
Acad. Dra. María Teresa Miras Portugal
Acad. Dr. Federico Mayor Zaragoza

ITALIA

Acad. Dr. Rodolfo Paoletti

ANEXO III

SECCIONES

- A) SECCIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS, BIOFÍSICAS Y NATURALES (12 miembros)
- B) SECCIÓN CIENCIAS APLICADAS A LA SALUD (12 miembros)
- C) SECCIÓN CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y FARMACOLÓGICAS (12 miembros)

SECCION A: CIENCIAS BIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS, BIOFÍSICAS Y NATURALES

Acad. Dr. María Cristina Añón
Acad. Dr. Mirtha Biscoglio
Acad. Dr. Alberto A. Boveris
Acad. Dr. Néstor O. Caffini
Acad. Dr. Osvaldo Cascone
Acad. Dr. Silvia Hajos (**Coordinador Alterno**)
Acad. Dr. María L. Pita Martín de Portela
Acad. Dr. Edgardo Poskus
Acad. Dr. Otmaro E. Roses
Acad. Dr. Juan Pablo F.C. Rossi (**Coordinador**)
Acad. Dr. Alfredo Salibian
Acad. Dr. Regina L.W. de Wikinski

• **SECCION B: CIENCIAS APLICADAS A LA SALUD**

Acad. Dr. Ricardo A. Caro
Acad. Dr. Roberto Coco (**Coordinador alternativo**)
Acad. Dr. Miguel D' Aquino
Acad. Dr. Tomas De Paoli
Acad. Dr. Héctor I. Giuliani
Acad. Dr. Carlos A. Gotelli (**Coordinador**)
Acad. Dr. Alfredo A. Hager
Acad. Dr. Manuel R. Limeres
Acad. Dr. Horacio J. G. Mato
Acad. Dr. Marco Pizzolato
Acad. Dr. Francisco J. E. Stefano

- **SECCION C: CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y FARMACOLÓGICAS**

Acad. Dr. Carlos M. Baratti

Acad. Dr. Clyde N. Carducci

Acad. Dr. Miguel A. Caso

Acad. Dr. Alberto Diaz

Acad. Dr. Carlos H. Gaozza

Acad. Dr. Alberto Gurni

Acad. Dr. Gabriel O. Gutkind

Acad. Dr. Mario A. Los

Acad. Dra. Virginia Martino **(Coordinador alterno)**

Acad. Dr. Marcelo C. Nacucchio

Acad. Dr. Marta M. Salseduc **(Coordinador)**

Acad. Dr. Marcelo Squassini

Acad. Dr. María Guillermina Volonté

160º ANIVERSARIO



La **ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA** invita a la Sesión Pública Extraordinaria con motivo de celebrar el 160º aniversario de su creación. El acto se realizará el miércoles 10 de agosto de 2016, a las 18 horas, en la Sala de conferencias "Pbro. Antonio Sáenz" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA Junín 956 PP Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

- Palabras de Bienvenida del Presidente Acad. Dr. Manuel R. Limeres
- Entrega del diploma de Acad. Emérito al Dr. Modesto C. Rubio.
- Conferencia a cargo del Acad. Dr. Guillermo Lossa, quien será presentado por el Acad. Dr. Miguel D'Aquino, sobre *"Epidemiología y control de enfermedades transmitidas por Aedes Aegypti. Conocimiento versus Aplicaciones."*
- Entrega de los Premios correspondientes al año 2014:
 - Premio Trienal Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica a la ANMAT
 - Premios Rebeca Gershman y Ricardo A. Margni 2014
- Brindis de honor

Esperando contar con su presencia, saludamos muy atentamente

Acad. Dr. Gabriel Mato
Secretario General

Acad. Dr. Manuel R. Limeres
Presidente

PALABRAS DEL PRESIDENTE ACADEMICO DR. MANUEL LIMERES (desgrabación)

Buenas Tardes a todos. Muy bienvenidos. Están son las palabras de bienvenida, pensaba. Palabra de bienvenida... Qué significa cumplir 160 años y poder dar la bienvenida.

El otro día me hicieron una entrevista por la radio a raíz de este tema y cuando me planteaba lo de los 160 años yo dije qué fácil se dice y que difícil que es llegar y haberlo vivido, y haber transitado sobre. Lo pensaba en función de que cumplimos este número 160 en el mismo año en que la Nación Argentina celebra el bicentenario de 1816. Quiere decir que 40 años después de que la Nación se creara con voluntad de ser Nación ya un grupo de profesionales farmacéuticos fundaron la primera institución farmacéutica del país y crearon entre otras cosas la primera revista científica farmacéutica de habla hispana, la Revista Farmacéutica que desde 1858 hasta hoy se viene editando con continuidad.

Ese grupo de profesionales de aquel entonces tenían algunos objetivos, algunos de corto plazo los lograron enseguida: crear una carrera de farmacia. Y la carrera de farmacia se creó como Escuela de Farmacia de la Facultad de Ciencias Médicas en 1864. Así que los logros comenzaron al poquito tiempo de haber iniciado sus actividades. Primero la revista y un par de años después la carrera de Farmacia. Tenían más objetivos: se habían planteado poder desarrollar una Farmacopea y ahí intervinieron en la redacción de la primera edición Farmacopea sobre fines del siglo XIX. Y también habían planteado, porque era netamente una institución científica profesional, la posibilidad de generar una ley regulatoria del funcionamiento de la farmacia.

Ahora, retomando esos 40 años de diferencia que hubo entre el 9/7/1816 y 1856 pensé qué pasaba en nuestro país en ese entonces, qué cosas ocurrieron, cuánto costó a este nuestro país estructurarse como estado. De la voluntad expresada en 1816 de ser una nación independiente hasta que se estructura, finalmente, un estado nacional pasan esos 40 años (estamos hablando de 40 o un poco de años más). ¿Y por qué se llamó Asociación Farmacéutica Bonaerense...? Bueno, porque en 1856 la Provincia de Buenos Aires no estaba integrada a las Provincias Unidas del Río de la Plata. Recién en 1860 se integra a la nueva Constitución, la Constitución de 1860, que es en la ingresa la Provincia de Buenos Aires a la Nación Argentina. Y entonces, lógicamente, ahí, para esa época interviene dos veces la misma persona, desde el estado, en cuestiones vinculadas con esta academia, esta academia surgente, que es el que después fue el Presidente Mitre. Porque siendo el ministro de gobierno de la Provincia de Buenos Aires corrobora la creación de la Asociación Farmacéutica Bonaerense. Y siendo él presidente de la nación convalida esa modificación que hay en la denominación de la sociedad, que pasa a llamarse Sociedad Nacional de Farmacia ya que justamente la nación nacía en 1860, ahí en esa época.

Cuando pensé en esos 40 años de diferencia que hay entre una creación y la otra, cuánto le costó a nuestro país poder constituirse como estado hasta 1860, 1880 en realidad, cuando finalmente el interior vence a la provincia de Buenos Aires para poder tener la aduana, el puerto que era lo que importaba. Así que esa es la situación de la que veníamos y las situaciones a donde vamos porque en todos estos años transcurridos en la Asociación Farmacéutica Bonaerense y luego Sociedad Nacional de Farmacia, después Asociación Farmacéutica y Bioquímica Argentina, luego Academia Argentina y finalmente Academia Nacional, ese largo peregrinar de las profesiones nuestras, primero las farmacéuticas y luego a partir de 1920 la profesión bioquímica. Todo lo que fue ocurriendo en nuestra vida institucional, intervinieron en nuestra sociedad innumerables personalidades, la más importante quizá fue Bernardo Houssay que como todos sabemos antes de ser médico se había recibido de farmacéutico y había trabajado mucho por la profesión, es más en la celebración del centésimo aniversario de la Sociedad Farmacéutica Bonaerense es quien da conferencia que hoy le corresponde al Dr. Lossa. (Así que Dr. Lossa hoy lo comparo con Houssay. Entonces... ¿Para qué...? Bueno, para subirle el ánimo.) Así estamos pensando entonces en cómo van a ser los próximos 40 años, cuando esta Academia cumpla 200 años de vida, venimos hablando de aquellos 40 años de diferencia y ahora los próximos 40 cuando, me preguntan 40 años... De acá a 40 años quizá alguno de los investigadores jóvenes que hoy reciban su premio por el trabajo presentado el año pasado a la Academia pueda ver que pasa de aquí a 40 años. Pero nosotros tenemos que pensar que lo que hoy hagamos, va a repercutir en el futuro.

Estas son, así sencillas las palabras que les quería decir de bienvenida. Así que les agradezco mucho, a todos, la presencia.

“Epidemiología y control de enfermedades transmitidas por Aedes Aegypti. Conocimiento versus Aplicaciones.”

Conferencia del Acad. Correspondiente Dr. Guillermo Lossa (desgrabación)

Vamos a tratar de comentar breve y en un lenguaje más o menos cotidiano que nos está ocurriendo con las enfermedades transmitidas por aedes. Vamos a hablar de repasar los conocimientos, la situación actual en la que nos encontramos, los mecanismos de transmisión y como los podemos controlar.

En el repaso de los conocimientos tendríamos que decir que los mosquitos y zancudos son insectos que pertenecen a la díptera, familia culicidae, provistos de dos alas funcionales. Lo más importante es que tienen una metamorfosis completa: pasan de huevo a larva, pupa y adulto y depositan sus huevos en racimo o aislados en agua de curso lento o aguas estancadas, en lugares donde puedan humedecerse al ocurrir una inundación.

Los mosquitos tienen proboscis penetrante y son las hembras las que pica. Pican simplemente por la necesidad de obtener proteínas para la fertilización de los huevos. El tiempo de desarrollo del huevo adulto es de 10 a 14 días. Y lo más importante es que una vez depositados los huevos en los cursos lentos de agua, en las paredes, pueden esperar muchísimo tiempo antes de transformarse en la forma adulta y esto le da una característica de resistencia que a veces no valoramos..

La vida, el apareamiento, se realiza cuando la hembra busca alimentarse, eso atrae al mosquito macho. Y esto es importante por algo que voy a comentar después, en ese momento se produce la copulación. Una vez inseminada, la hembra, los espermatozoides que lleva le son suficientes para fecundar todos los huevos que va a poner o sea que con una sola inseminación es suficiente para la fertilización. Pasa por todas las etapas desde el imago, que es el adulto, el de larva y el estado de pupa. Y en el estado de pupa es donde puede sobrevivir incluso a la desecación en los bordes de los lugares con agua. La otra característica es que si la hembra puso los huevos mientras estaba infectada y los huevos infectados, los mosquitos que nazcan ya van a nacer con la posibilidad de transmitir la infección.

Y esto es muy importante porque a veces no le prestamos la debida atención.

El aedes aegypti vive en el peridomicilio, es decir, un mastopulos que vive en el domicilio y en la cercanía al domicilio, que muere a una temperatura inferior a 4°C o superior a los 40° C. Sobrevive entre 15 y 30 días. Tiene un radio de vuelo promedio de 40 a 60 metros (entre la vivienda y viviendas vecinas). Puede transportarse más a través de las corrientes de aire pero no más de 800 metros excepto que sea transportado por algún vehículo. Cada hembra puede llegar a depositar 700 huevos. Esto nos pone en un alto riesgo de proliferación de los mosquitos.

Breve reseña histórica y situación actual

Actualmente el desplazamiento de las personas ha sido el que generado el traslado de los mosquitos hacia diferentes lugares. El aedes llego a América en la época del tráfico de esclavos desde Africa. Y partir de ahí se desarrolló en América, se erradico y va y viene. El gran problema es el traslado de personas que lleva el aedes de un lugar a otro. El otro problema se ve afectado por la deforestación, el calentamiento global, el fenómeno del niño. Todo eso afecta. Y el gran problema es la urbanización desorganizada. El problema de la urbanización desorganizada sumado a la gran cantidad de descartables que usamos, se pueden ver flotando

en el río, en los momentos de tormentas van a ver gran cantidad, es más hay lugares en el océano en donde hay islas de descartables, eso hace que sirvan de depósito para los huevos de los mosquitos y aumenta el riesgo

En 1947 la OMS se planteó la erradicación de los mosquitos. En el 55 esta era la situación de la proliferación de aedes en nuestro país. En el 63 en la Argentina se logró erradicar el aedes lo que fue confirmado por la OMS en el 65. Y en el 1987 vuelve a aparecer el aedes. Y a partir del 86 ingresa al país, avanza en el 87 todo el territorio anterior y mas.



Esto nos pone en esta situación

Se piensa que hoy parecería imposible erradicar el aedes. Va a requerir un gran esfuerzo para poder lograr lo que se logró en el 55. Eso no es fruto de la casualidad las condiciones de vida, la población era diferente, la forma de vida poblacional era diferente, los descartables no existían, todo eso nos ha complejizado las cosas.

En el año 1998 aparece el dengue en el noroeste y noreste argentino con brote todos los años menos en el 2001 y 2005.

En el 2008 hay un brote selvático de fiebre amarilla. Casos de FA en países vecinos ya no selváticos sino urbanos por la deforestación dado que lo monos también migran (a partir de los monos se han producido los casos de FA. En el 2009 hubo casos autóctonos de dengue en BS. As. (26000 casos). En 2015 hubo un broto en Córdoba.

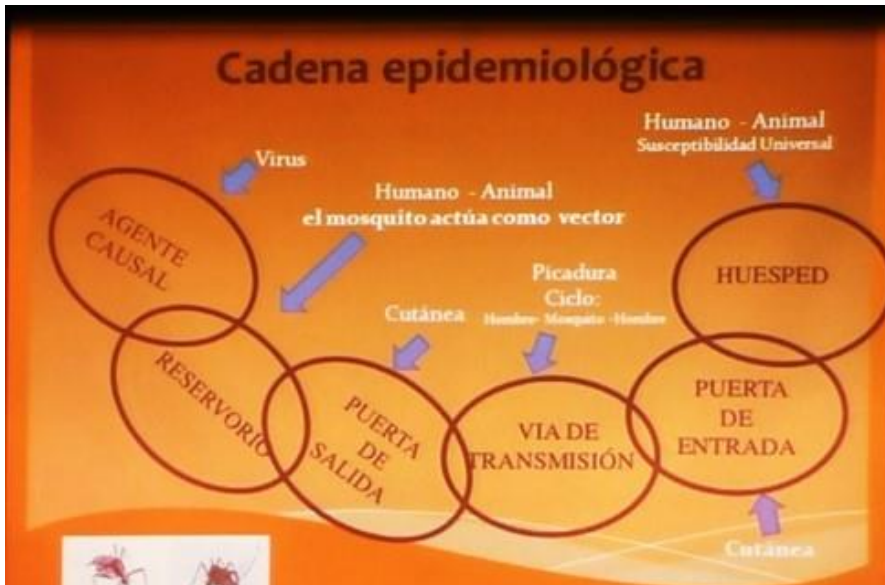
En el 2016 el dengue es considerado el principal arbovirus en el país con antecedentes de circulación de los 4 serotipos que tiene el dengue.

El aedes aegypti actúa como vector no solo del dengue sino que también actúa como vector del virus de Zika, del virus de FA, del virus del Nilo Oxidental, del virus de encefalitis de San Luis, del virus de la encefalitis japonesa, Y del virus del genero alphavirus, familia Togaviridae, como es el virus chikungunya, y el virus de la encefalitis equina. Todos estos están presentes hoy en la Argentina.

Nosotros nos vamos a detener en tres de ellos: el dengue, el zika y el chikungunya.



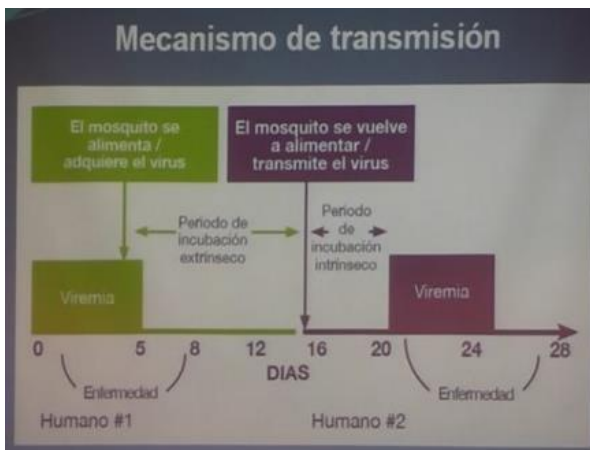
La cadena epidemiológica es más o menos la misma para todos. Es decir hay un agente causal que es el virus, HAY un reservorio que es Humano o Animal y el mosquito actúa como transmisor con una puerta de salida que es la cutánea, una vía de transmisión que está dada entre hombre-mosquito-hombre, una puerta de entrada que es la cutánea y un huésped.



Esto hasta ahora era así. A partir de este año se ha visto, que el virus zika puede transmitirse por relaciones sexuales, puede transmitirse por sangre y puede transmitirse de madre al feto si la madre adquiere la infección durante el embarazo. Entonces la vía de transmisión ya no es solo a través del vector sino que hay una vía de transmisión directa. Es más en este momento hay en EE UU un estudio, un caso de un colega que adquirió el virus zika y que parece ser que no estuvo en zona endémica ni tuvo

relaciones con nadie que haya estado en zona endémica por lo cual se está considerando como de posible transmisión hospitalaria. Pero no se sabe todavía esto porque es fresco: es de hace 10 días.

Lo que si estamos viendo es que es más problemático de lo que pensamos porque la mayoría de estas enfermedades enrajan en el grupo de las enfermedades olvidadas, que no le dábamos la trascendencia que tenía.

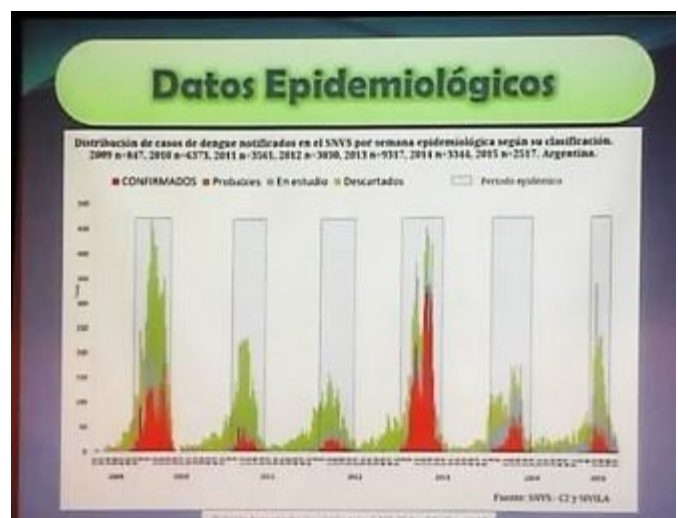


Estos son los brotes que han ocurrido en nuestro país.

Desde 2009. En 2013 tuvimos un brote importante y en 2014 y 2015 de menor intensidad.

La incubación se produce en dos periodos: un periodo intrínseco que es el que produce el mosquito y un periodo extrínseco que es el que produce en el ser humano.

Si entramos a hablar de dengue la OMS estima que cada año ocurren entre 50 y 100 millones de infecciones con 20 a 25000 muertes con un alto impacto económico y social en más de 100 países.



Que nos está ocurriendo hoy en el 2016? En lo que va en la semana epidemiológica 1 a la semana epidemiológica 24 o sea desde enero a Junio se notificaron en Argentina 74782 casos con sospecha de dengue incluyendo confirmados, descartados y en estudio. Se ellos 39841 eran casos confirmados y probables autóctonos distribuidos en 15 jurisdicciones del país y 2609 eran casos confirmados y probables importados. O sea que tenemos un predominio de autóctonos. Se descartaron 17540 casos. Pero lo más importante surge de que tenemos brotes de dengue sostenidos en la Pcia. de Bs. As., CABA, Córdoba, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán. Casos esporádicos en Catamarca y La Rioja

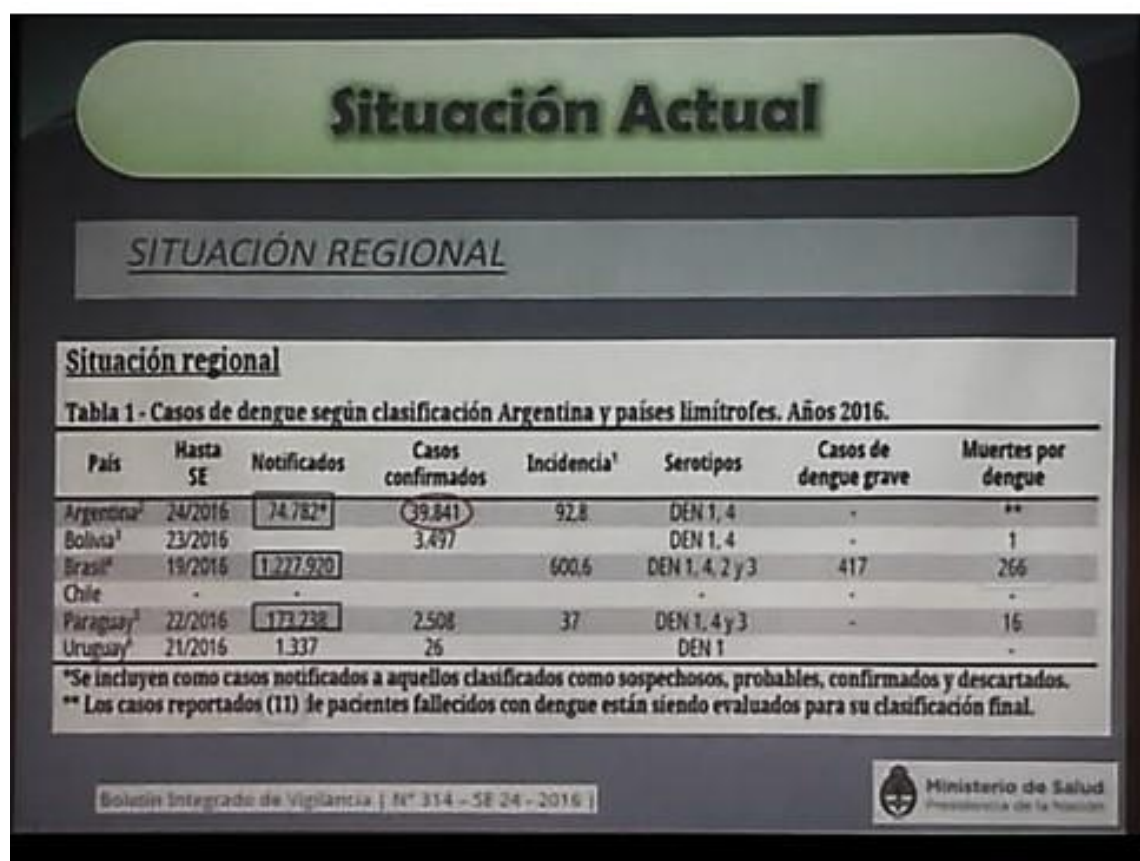
En las primeras 24 semanas se superó en un 14,98% a los registrados en 2009. Y tuvimos 3 picos: 1 en la semana 4, otro en la semana 8 y 9 y otro en la semana 14 que corresponde al mes de abril.

Por qué se da esto.

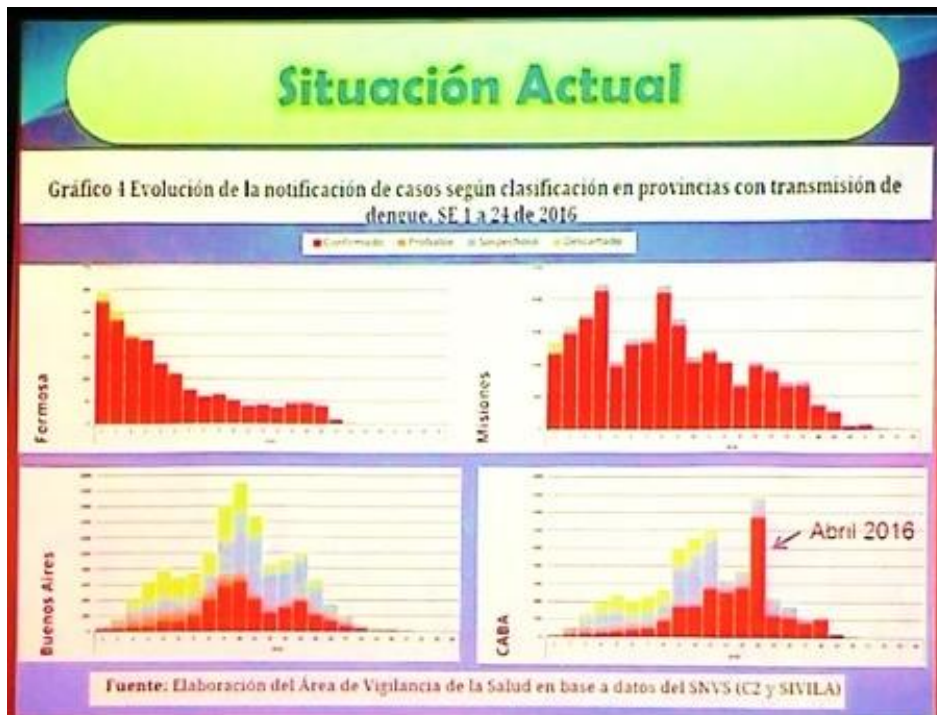
Probablemente el brote ha sido más precoz que en otros años, con mayor número de casos y una distribución geográfica más amplia atribuible al flujo de viajeros a áreas de transmisión, al fenómeno de “El Niño” con altas temperaturas y precipitaciones y a las inundaciones en el litoral.

La realidad es que lo estamos teniendo y en esto aumenta el riesgo no solo para el dengue sino para otras arbovirosis.

Si nosotros analizamos lo que paso en la Argentina: dijimos que teníamos 74782, 39000 casos autóctonos confirmados (Nosotros tenemos un muy alto número de confirmación. Eso es muy bueno, se está trabajando muy bien en los laboratorios del país en la confirmación bacteriológica). Hubo 11 muertos en la Argentina. En Brasil en lo que va de este año hubo 1.227.920 (menos que en la anterior, en 2015 tuvieron mucho mas) con 266 muertos. En Paraguay 173238 casos con 16 muertos.



Los dengues en la Argentina fueron tipo 1,4; en Brasil fueron todos.



Si nosotros vimos esto por algunas provincias, fíjense que Formosa casi todos los casos están confirmados y empezó en la semana 1 y perduro hasta la semana 24. Mientras que en Misiones, fíjense que es más voluminosos el número de casos, no viene en descenso como en Formosa sino que es más perdurable. Esto es importante porque mucha gente va de vacaciones a Cataratas y después volvemos a nuestros lugares de origen. En la Pcia. de Buenos Aires se dio esta situación, con un brote en la SEMANA 9 Y 10. En la ciudad

de BA el brote se dio en la semana 14. Fue un brote bastante importante.

En CABA se dieron 4771 casos autóctonos todos de dengue 1. En Santa Fe se dio dengue 4. Mientras que el mayor número de casos fue en Misiones, 24844. Hubo dengue importado en La Pampa. San Luis, Mendoza y San Juan.

Qué nos dice esto.

Que estamos con un problema importante de dengue, que tendremos que ver que nos va a suceder el año que viene. Eso es lo importante a pensar.

El periodo de incubación es de 5 a 7 días, en muchas formas asintomáticas, la fiebre se limita a 2 a 7 días, da dolor de cabeza brusco, mialgias, produce una enfermedad sistémica muy dinámica. Y lo más importante es que a veces pasa que el paciente se recupera, se le pasa la fiebre, y a las 48 horas se reagudiza y pasa a ser un cuadro fatal. <por eso hay que tener mucho cuidado en el periodo post febril.

Las formas graves con manifestaciones hemorrágicas y pérdidas de plasma por aumento de la permeabilidad vascular es más frecuente en las personas que ya padecieron dengue por un serotipo y se infectan nuevamente con un serotipo diferente. Y hay muchos que son asintomáticos por lo cual muchas veces no sabemos y padecieron el dengue o no por un serotipo anterior.

Situación Actual

A- Áreas con transmisión sostenida

Región	Provincia	Casos confirmados y probables autóctonos	Serogrupos	
CENTRO	Buenos Aires	3.205	DEN 1 predominante	DEN 4 casos aislados
	CABA	4.771	DEN 1	
	Corrientes	600	DEN 1	
	Entre Ríos	110	DEN 1	
	Santa Fe	1.430	DEN 1 predominante	DEN 4 en Rosario, La Capital y 9 de Julio
NDA	Chaco	2.546	DEN 1	
	Corrientes	412	DEN 1	
	Formosa	1.479	DEN 1	
	Misiones	24.844	DEN 1	
NDA	Jujuy	500	DEN 1	
	Salta	1.401	DEN 1 predominante	DEN 4 en General Güemes, Orán y Aguay
	Santiago del Estero	310	DEN 1	
	Tucumán	59	DEN 1	

B- Áreas con transmisión circunscripta a barrios y/o localidades

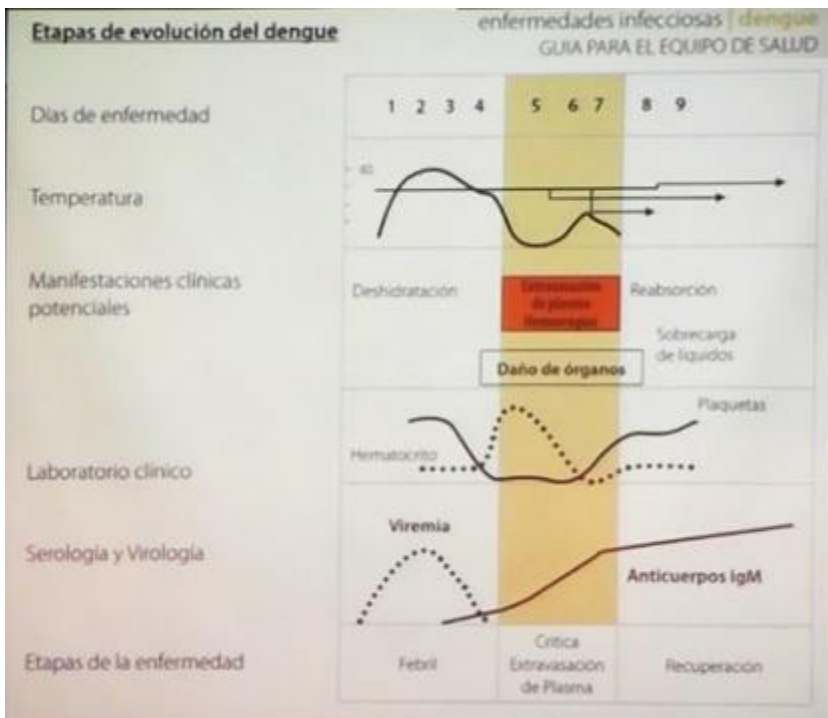
Provincia	Casos confirmados y probables autóctonos	Serogrupos
CATAMARCA	5	DENV
LA RIOJA	5	DENV

C- Casos importados confirmados y probables en provincias con presencia del vector y sin casos autóctonos

Provincia
LA PAMPA
SAN LUIS
MENDOZA
SAN JUAN

Y afecta a órganos y sistemas como pueden ser encéfalo, miocardio,

Lo más importante que tenemos que tener en cuenta es que una persona con dengue que parece recuperada hay que tener cuidado 48 horas por correr altísimo riesgo de entrar en un cuadro grave hemorrágico y shock.



Si vemos la evolución de la primera fase que es la febril, después pasa a una etapa crítica y después a recuperación

En la fase febril en donde se produce la transmisión, los síntomas digestivos (dolor abdominal y diarreas), manifestaciones hemorrágicas leves (gingivorragia, petequias, epistaxis, metrorragias) que no corresponden a cuadros de Dengue grave, si hay leucopenia, hay trombocitopenia y aumento de las transaminasas.

En la etapa crítica ya hay extravasación de plasma con aumento de hematocrito, shock hipovolémico y lo más importante a controlar es la diferencia de la presión.

Y en la etapa de recuperación vigilar sobre todo las 48 horas para verificar que no hay una decaída.

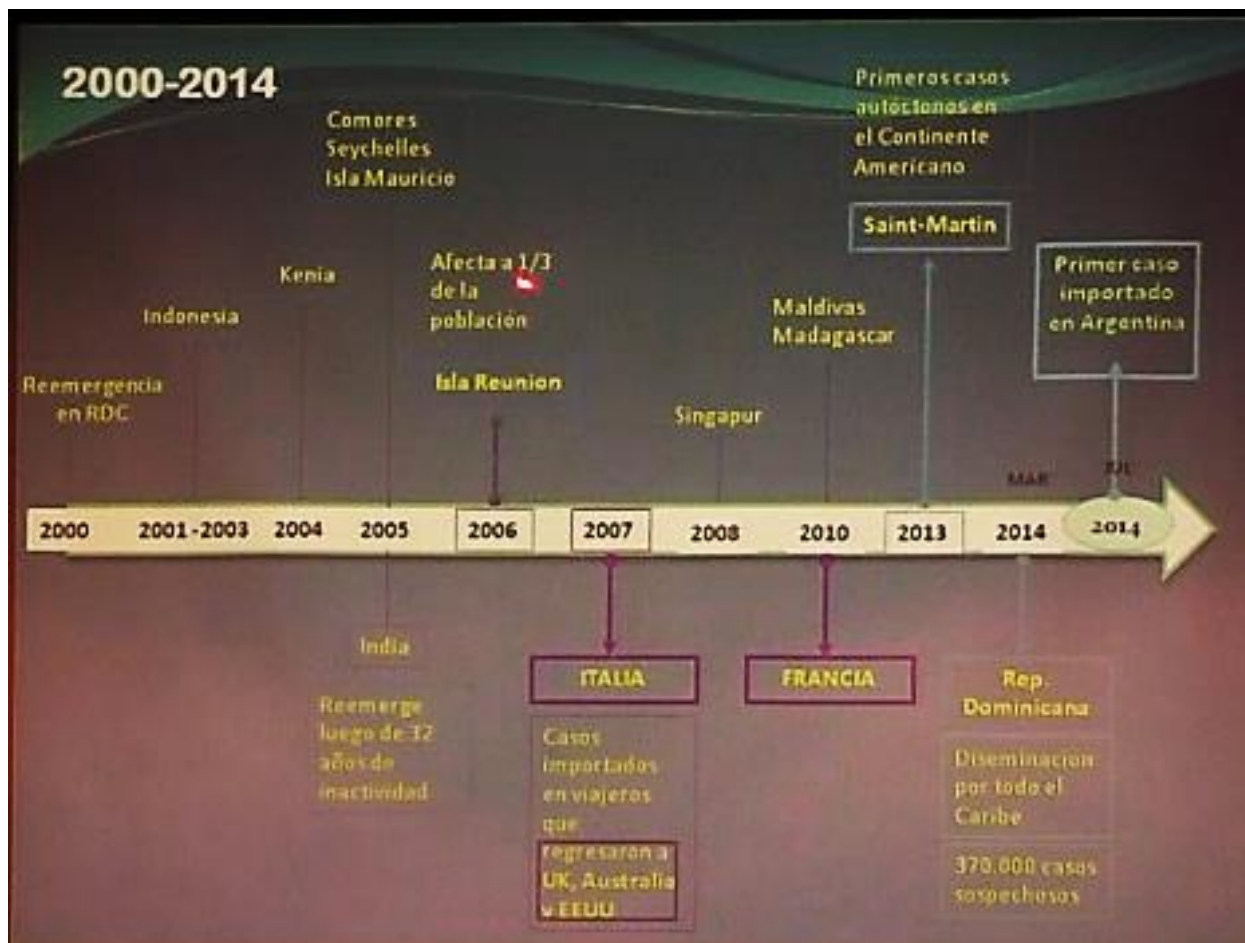
La clasificación de dengue se ha estudiado mucho. Últimamente la OMS decidió definirlo como dengue y dengue grave y dengue con síntomas de alarma y sin síntomas de alarmas. Los síntomas de alarmas son el dolor abdominal intenso y sostenido, vómitos persistentes, derrame seroso (pleural, pericárdico, peritoneal), sangrado de las mucosas, somnolencia, la hepatomegalia.

El dengue sin síntomas de alarma se trata en su casa y cuando tiene alguno de estos síntomas entonces hay que internar en terapia intensiva.

Lo más importante a considerar dentro de los estudios para seguimiento del paciente son las plaquetas y el hematocrito. En los primeros días podemos identificar la enfermedad por el antígeno NS1 o por PCR en tiempo real o aislamiento del virus. Después NS1 y método indirecto como IgM. Y después de pasados los 7 días por IgM y panel viral.

En cuanto a la vacuna Sanofi Pasteur desarrolló una vacuna con bastantes buenos resultados en los países que la han aplicado. Previene 8 de cada 10 hospitalizaciones y hasta el 93% de los casos graves. Se aplica en personas 9 a 45 años. México, Filipinas, Brasil y El Salvador ya lo están aplicando. En Argentina se estaba la posibilidad de que se aplique en las zonas endémicas.

Si hablamos de Chikungunya, es una enfermedad que estaba dentro de las enfermedades olvidadas, es el que se encorva por el dolor de las articulaciones. Es una enfermedad emergente descrita en 1952 en Tanzania. Desde entonces ha afectado a millones de personas. Estuvo en Oceanía y a fines de 2013 pasa a América. La fiebre es importante y el problema fundamental está dado en los cambios climáticos, acción viral y la urbanización desorganizada no en Argentina sino en un montón de países.

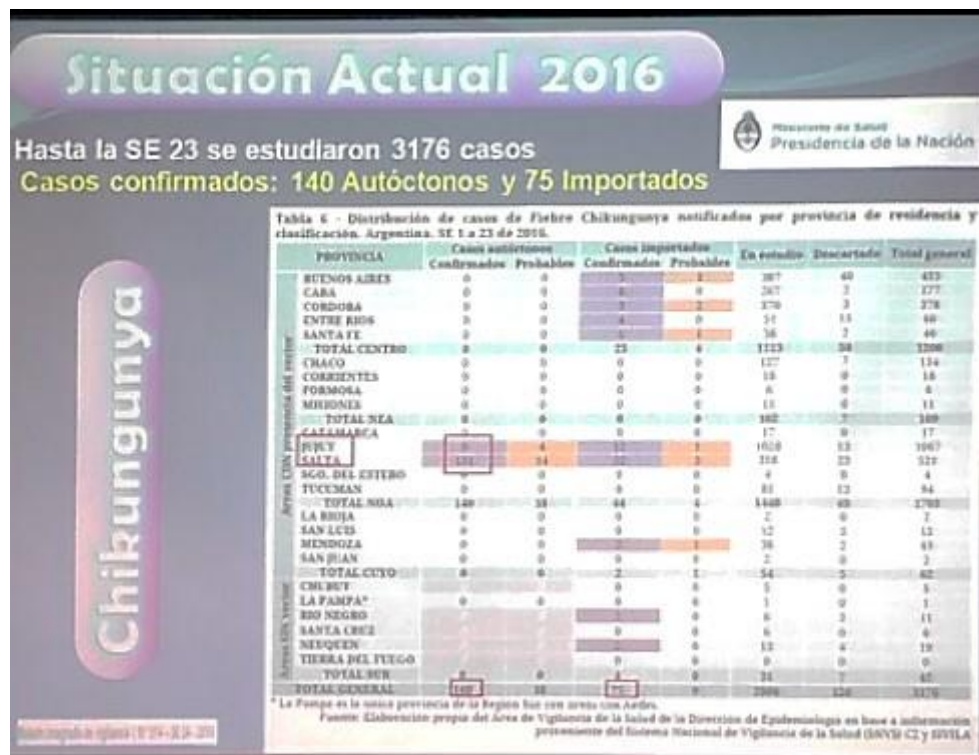


Si vemos la evolución, hasta el 2006 fue en Oriente. En 2007 llega a Italia, Reino Unido, Australia y EE. UU. Casos importados por viajeros. En el 2010 tiene casos importados en Francia. En el 2013 en el Caribe. En Marzo del 2014 se dan casos en Rep. Dominicana. Y en julio tenemos casos en la Argentina. Qué fue.. Los viajeros que nos vamos de vacaciones en el invierno al calorcito del Caribe.

En 2014 la Argentina incorpora el SNVS, la notificación individual inmediata. Se presentaron 134 casos sospechosos, se confirmaron 26, 25 probables. Todos con antecedentes de viaje. En 2015 hubo 1281 casos sospechosos, 21 confirmados, 22 probables. Todos importados.

En 2016, hasta la semana 23 se estudiaron 3176 casos. Venimos en un aumento bastante importante. Con 140 casos autóctonos y 75 importados. Los casos autóctonos fueron en Salta y Jujuy. Y los casos importados se dieron en la Pcia. De BsAs, CABA. Córdoba Entre Ríos y Santa Fe. Pero como ven estamos en un problema serio para el año próximo.

Las manifestaciones clínicas más importantes son la fiebre y el dolor articular. Tiene un período de incubación de 1 a 12 días, siempre es sintomático, no da manifestaciones hemorrágicas, tiene baja letalidad y puede confundirse con el dengue. Lo más importante fiebre de aparición brusca, dura 2 o 3 días. dolor articular bilateral predominio de manos y muñecas, sin traducción radiológica (la radiografía no nos va a dar nada). Exantema, maculopapular pruriginosa, en tronco y extremidades y leucopenia, aumento de transaminasas, plaquetopenia, más leve que en dengue. PCR y ERS elevada.



ZIKA

La OMS estima que hay 1,5 millones de personas afectadas y prevé que pudiera superar los 4 millones

El Zika se descubre en 1947 identificado en los monos del bosque Zika (Uganda). Hubo muchas habladurías diciendo que era un virus de producción de armas biológicas. No es así. Científicamente no está probado.

Se ha ido propagando. E 3/3/2014 Cjile confirmo casos autóctonos de Zika en la Isla de Pascua.

En mayo de 2015 Brasil confirmo la transmisión en el nordeste del país.

La OMS produce un alerta epidemiológicos el 7/5/2015 . el 15/5/2015 Brasil confirma casos. Argentina empieza a hacer vigilancia el 19.

Es Flavivirus de transmisión de la enfermedad con similares cuadros y evolución de 4 a 7 días de fiebre. Se asocia a conjuntivitis, cefaleas, a veces da síntomas abdominales. E tratamiento es sintomático. No hay muertes descritas en los brotes.

Si estamos en el problema que desde la semana epidemiológica 1 de 2016 se registraron 3530 casos sospechosos de microcefalia, incluidos 46 fallecidos en Brasil. Esto es lo que ha generado el pánico internacional.

El 1/2/2016 la OMS declara "Emergencia en Salud Pública internacional por Virus Zika" con posible asociación con trastornos neurológicos y microcefalia.

Brasil confirma el aumento de anomalías congénitas (microcefalia) y casos de Guillain Barré asociados a la infección. Y hasta la fecha hay 41 países que están reportando casos autóctonos en América



Que esta pasando actualmente ...

El 25/7/2016 nace el primer bebe con microcefalia en Barcelona. El bebe esta estable y no ha requerido ninguna reanimación.

22/7/2016 tambien lo hubo en Nueva York . Se confirmo algo que llama la atención: habitualmente la enfermedad de transmisión sexual es mas fácil que pase del hombre a la mujer que de la mujer al hombre. Sin embargo tuvieron un caso de transmisión de la mujer al hombre. Y esto también es otro signo de alerta respecto a que esta pasando con este virus.

Tambien en julio de 2016 se probó la reducción que produce la generación de mosquitos a través de una transformación genética que se hizo en laboratorio de Inglaterra que hicieron una modificación genética del mosquito macho por lo cual cuando insemina las hembras, los huevos que pone la hembra no están en condiciones de generar mosquitos con problemas. Esto ha dado un 91% de resultados cuando se liberaron estos mosquitos en algunos barrios de Brasil. Parece que sirve. No sabemos que va a pasar con esta transgresión que estamos haciendo.

Aparece, pre mundial, ropa que se esta vendiendo para la gente que va a los juegos olímpicos ropa con repelente. Estudiando eso vi que impregnan la tela permetrin y citronela que dicen que dura 6 meses.

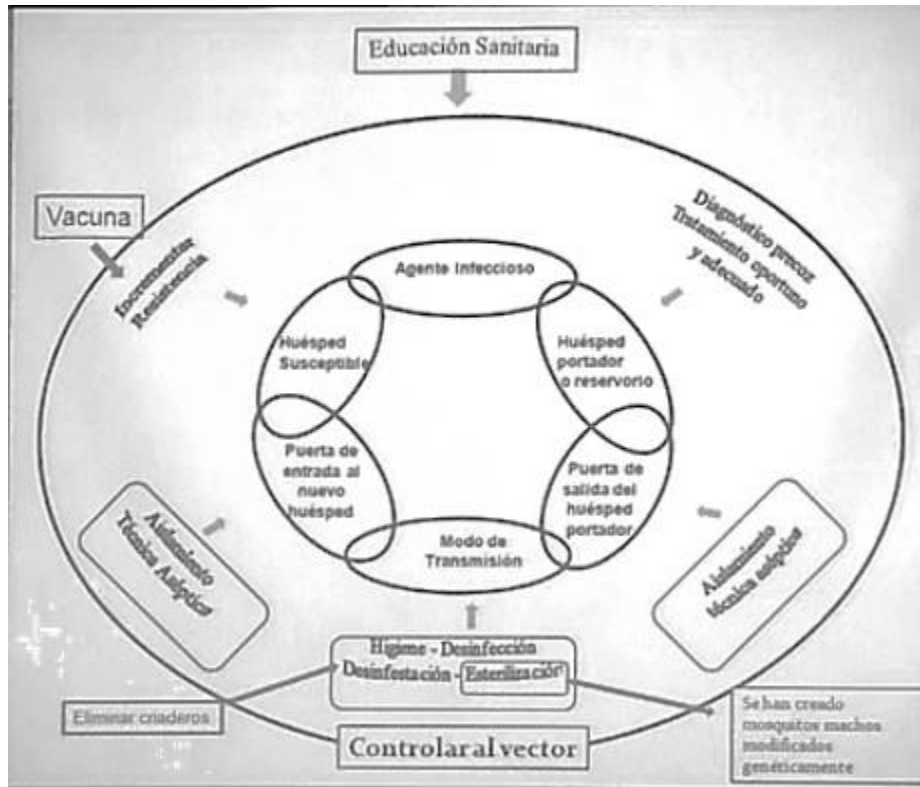
En la Argentina hasta la semana 23 se produjeron 1723 casos estudiados. Se identificaron 31 casos positivos autóctonos, 22 confirmados y 9 probables.. 1 caso confirmado, por transmisión sexual, en Cordoba, 19 casos importados (1 confirmados y 2 probables. Se produjo el primer brote en la Argentina en San Miguel de Tucuman y dos ciudades vecinas. Lo importante es que se dio con un periodo en que los síntomas iniciaron en la semana 17. Fue un brote bastante importante. Hubo un caso mas diagnosticado en estos días.

VACUNA

Hay dos vacunas que se exploraron ratones que demostraron ser efectivas. Falta las exploraciones de etapa humana. Hay 3 empresas farmaceuticas con convenios para desarrollar vacunas en la Argentina: Protein Sciences Corp. Con sede en EE.UU., Sinergium Biotech con sede en BSAs y Mundo Sano (fundación presente en Argentina, España y Africa)

Concluison

Estamos ante una enfermedad transmitida por artrópodos, que estaba dentro de las enfermedades consideradas olvidadas que ha tenido una reemergencia y que es todo un desafío para el futuro. Ojala pudieramos llegar a lo que ocurrió en el 55. Va a requerir un gran esfuerzo.



Nosotros sabemos que podemos actuar sobre el vepo haciendo que sea menos susceptible con las vacunas. Se esta trabajando en ello. Sabemos que podemos actuar a través de la cadena de transmisión con la higiene y la desinfección. Y esteriliacion. Controlar al vector. Controlar al vector significa erradicar criaderos Y lo que se ha hecho, vamos a ver que pasa, con la modificacion genética cuando ellos se magnifique y a que sitaucion nos va a llevar a futuro.Porque nunca sabemos con la manipulación genética en el medio ambiente a que podemos llegar.

Lo mas importante es la educación. Y a ese respecto estamos en un grave problema. Porque la educación tiene que ser de todos y por todos. Y es frecuente vernos con estas situaciones. Hoy via a la CABA mas limpia.

El ministerio de Salud esta trabajando con cantidad enorme de publicaciones para todo publico, para el ciudadano y el profesional.

Se han dado recomendaciones apara los viajeros que fueron a los juego olímpicos. Estas recomendaciones son a nivel internacional en cuanto a la protección y las relaciones cuando vuelvan de los juegos olímpicos porque por 60 dias corre el riesgo de ir trasnmitiendo la enfermedad . La precaucion era que las embarazaran procuraran con viajar por el riesgo de la microcefalia,

Que vemos, que hacemos y que pedimos.

Lo que vemos: piscinas con suciedad,

Lo que hacemos:

Que pedimos: cuando estamos en la epidemia, pedimos la fumigación. Y la fumigación sirve a medias porque va a matar al mosquito adulto pero no va a matar al huevo. Aparte de la fumigación hay que eliminar los recipientes que acumulan agua en las casas y espacios públicos. Si suben a un edificio alto van a ver que en el techo de la casa elemento viejos que acumulas agua. Es difícil poder actuar en la urbanización descontrolada como son las villas que acumulas residuos y descartables

Cuál es la propuesta

Cambiar conductas en todos los niveles.

Tolerancia 0 al incumplimiento de normas y medidas de prevención y control

160° JORNADA CIENTIFICA



*Academia Nacional
de Farmacia y Bioquímica*

1856 - 2016

JORNADA CIENTIFICA 160° ANIVERSARIO

(Coordinación: Acad. J.P. Rossi – Acad. A. Salibian)

NUEVAS ESTRATEGIAS EN ECOTOXICOLOGIA Y TOXICOGENOMICA **Aportes teóricos y experimentales de la Bioquímica**

Estimados colegas y amigos:

Tenemos el agrado de dirigirnos a ustedes para invitarlos a acompañarnos en la Jornada organizada por la Sección Bioquímica en el marco de la celebración del 160° aniversario de esta Academia.

La misma se llevará a cabo el **1° de setiembre de 2016** en el Salón de Conferencias "Pbro. Antonio Sáenz" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA, Junín 956 PP CABA.

Además de los investigadores a cargo de las ponencias indicadas en el Programa, se invita a jóvenes (becarios, tesistas) a exponer un resumen de su trabajo sobre temas afines al que convoca la Jornada; para cada una de ellas se han asignado 10 minutos.

Los interesados deberán enviar un resumen en español o inglés de acuerdo a las siguientes pautas:

Título: hasta 100 caracteres.

Autores: hasta 110 caracteres.

Lugar de trabajo: hasta 140 caracteres.

Cuerpo del resumen: hasta 1400 caracteres (incluyendo espacios).

Se solicita usar procesador de texto Word o similar y fuente Times New Roman 12 puntos.

Se seleccionarán 8 presentaciones cuyos resúmenes se publicaran en los "Anales" de la Academia.

Fecha límite para la recepción de resúmenes: **12 de agosto de 2016**

Enviar por email a: acad@ffyb.uba.ar

Los saludamos muy cordialmente

Acad. Alfredo Salibian

Acad. Juan Pablo Rossi

Junín 956 Planta Principal (1113) C.A.B.A. Tel.54-11-5287-4821 email: acad@ffyb.uba.ar

PROGRAMA	
10.00 – 10.10	Bienvenida. Presidente de la Academia Dr. Manuel R. Limeres.
10.15 – 10.45	Introducción. Acad. Dr. Alfredo Salibian.
10.45 – 11.30	“Un claro en el arduo camino utópico hacia la “huella digital” del impacto.” Prof. Dr. Andrés Venturino (CITAAC - UN Comahue - CONICET).
11.30 – 11.45	Café.
11.45 – 13.00	Exposiciones de investigadores jóvenes: Dra. Lascano C.I., Dra. Bernal-Rey D., Dra. Dopchiz L.P.
13.00 – 14.00	Receso para almuerzo.
14.00 – 14.45	“La era <i>ómica</i> en especies no modelos. Análisis transcriptómico para el desarrollo de biomarcadores.” Prof. Dr. Danilo Ceschin (CITAAC - UN Comahue - CONICET).
14.45 – 15.30	“Identificación de biomarcadores moleculares de exposición en organismos acuáticos.” Prof. Dr. Afonso C. Dias Bainy (Univ. Federal de Florianópolis-Brasil).
15.30 – 15.40	Café.
15.40 – 16.25	“Importancia de las relaciones jerárquicas en la interpretación de datos ecotoxicológicos.” Prof. Dra. Alicia E. Ronco (CIMA – UNLP - CONICET).
16.30 – 17.00	Exposiciones de investigadores jóvenes: Dra. Eissa B.L., Dra. Ossana N.A.
17.00 – 17.40	Mesa Redonda: expositores y asistentes.
17.40 – 17.50	Clausura.

NUEVAS ESTRATEGIAS EN ECOTOXICOLOGÍA Y TOXICOGENÓMICA

(Presentación del Académico Dr. Alfredo Salibián)

En setiembre de 2016 la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina celebró el 160º aniversario de su creación. Entre los actos programados para conmemorar la fecha, se organizó la Jornada Científica, con el tema convocante *Nuevas estrategias en Ecotoxicología y Toxicogenómica - Aportes teóricos y experimentales de la Bioquímica*, que fue coordinada por los Acad. Dres. Juan P. Rossi y Alfredo Salibián.

La reunión contó con presentaciones de los Profesores Dres. Andrés Venturino y Danilo Ceschin (Universidad Nacional del Comahue, Argentina), Alicia E. Ronco (Universidad Nacional de La Plata, Argentina) y Afonso Dias Bainy (Universidad de Florianópolis, Brasil). Además, varios investigadores/as jóvenes contribuyeron con breves aportes, temáticamente afines al tema general convocante.

Pocas semanas después de la realización de la Jornada, ocurrió el inesperado fallecimiento de la Dra. Ronco. La pérdida de la Profesora Ronco es una triste noticia para quienes tuvimos el privilegio de conocerla y tratarla. Nos queda el recuerdo de su trato y carácter entusiastas, de sus valiosos aportes científicos que a lo largo de varias décadas brindó generosamente desde la docencia de grado y de postgrado, la formación de recursos humanos así como en el diseño, conducción y realización de numerosos estudios ecotoxicológicos originales en diversos ecosistemas del país y de la región. Todo ello está atesorado en nuestra memoria.

Introducción.

Algunos autores definieron la Toxicología como la Ciencia orientada al estudio de los efectos adversos de los agentes físicos, químicos o biológicos sobre el funcionamiento de los sistemas biológicos en el contexto de los ecosistemas que habitan incluyendo la prevención y corrección de dichas consecuencias. Para estos propósitos se requiere recurrir a los saberes, conceptos, métodos y tecnologías propios de algunas Ciencias Básicas (Química, Biología, Estadística, Matemáticas, Medicina). Los adelantos que se registraron en la Toxicología han estado estrechamente asociados a los avances y conocimientos aportados por esas Ciencias, hasta convertirse en una disciplina multidimensional, que con el tiempo se expandió en aplicaciones prácticas (salud humana y animal, ambiente, industria).

Esas dinámicas sucedieron en coincidencia con una época caracterizada por aumentos en la variedad y producción de contaminantes emergentes (fármacos, pesticidas, productos industriales, etc.) que se incorporaron a los ambientes naturales y modificaron drásticamente sus perfiles de toxicidad, con registros y escenarios más complejos, superando los márgenes de oscilación propios de ecosistemas de baja diversidad biológica y química. Los efectos de aquéllos cambios deben ser considerados en su contexto actualizado, acoplado a nuevas presiones y perturbaciones, naturales y antropogénicas (por ejemplo, cambios en el uso del suelo, eutrofización, aumento de las poblaciones humanas en áreas urbanas, demandas sociales y energéticas crecientes, destrucción de hábitats, especies invasoras, *blooms* algales, etc). Además, se deben tener en cuenta los efectos del Cambio Climático sobre los parámetros ambientales que están afectando el funcionamiento integrado de los ecosistemas. El cuadro integrado de estos factores configura un estado ambiental de estrés y riesgo crónicos.

A comienzos del siglo XX se propuso, una categorización de la Toxicología, como disciplina descriptiva (u observacional), mecanística y regulatoria multidimensional. Para ello, se diseñaron, protocolos estandarizados, con una proliferación y variedad de métodos y *endpoints* de diverso carácter (molecular, bioquímico, biológico), muchos de los cuales exhiben su vigencia en la actualidad.

La Toxicología enfrentada a la demanda de conocimiento de la especificidad integrada de los efectos (o respuestas) de los tóxicos, dejó de ser la Ciencia limitada a los tóxicos, venenos e intoxicaciones y estableció nuevos vínculos con otras Ciencias que contribuyeron a la ampliación de sus incumbencias, a la precisión de sus evaluaciones, y la comprensión de los mecanismos de acción; generaron también áreas que impulsaron el desarrollo de un número de subdisciplinas “cooperadoras o contribuyentes” que aportaron nuevas herramientas y metodologías, que condujeron a resultados y conclusiones más precisos. Así, la Toxicología se afirmó en su carácter experimental, siendo reconocida actualmente como una Ciencia que adopta los conocimientos generados desde las Ciencias Básicas, expandiendo sobre esa base el campo de sus aplicaciones científicas, tecnológicas y prácticas.

Tal es el caso particular de la Toxicología Ambiental que abordó el estudio de problemas que generaban las nuevas entidades químicas y biológicas que se detectaban en los ambientes, en el marco de relaciones interdisciplinarias (por ejemplo, la Toxicología Genética, la Inmunotoxicología, la Toxicología reproductiva, la Ecotoxicología, la Microbiología, la Nanotoxicología, la Toxicología *in silico*, computacional o predictiva, las Omicas”, etc.) que contribuyeron a una comprensión actualizada y más precisa de las perturbaciones antrópicas y al abordaje de nuevos *problemas* ambientales (por ejemplo, la interferencia de los tóxicos en los sistemas químicos de comunicación interespecífica).

Algunos autores consideran que los cambios ambientales ocurridos configuran una nueva Era geológica, el Antropoceno (“Edad de los Humanos” o “de los rápidos cambios ambientales”) en los cuales el impacto de las actividades humanas se hizo tan importante como el de los procesos naturales. Sería la era siguiente al Holoceno, momento en que pudo haber ocurrido la adopción de la Agricultura por las sociedades humanas. La propuesta caracteriza este tiempo de rápidos cambios ambientales y tecnológicos, directa o indirectamente antrópicos y globales, que afectan la calidad toxicológica de los ambientes inaugurando una “nueva Toxicología”.

Ciencias Omicas - Genómicas.

La Toxicología expandió sus límites incorporando las *Ciencias Omicas*, extensiones éstas del dogma central de la Biología, esto es, la organización y flujo de la información del ADN al ARN y, finalmente, a una proteína. El término *ómicas* es un sufijo que se utiliza para referencias al estudio de biomarcadores de los vínculos de los genomas con la totalidad o conjunto de las biomoléculas funcionales de un sistema biológico particular; virtualmente todas las respuestas a estresores externos, involucran cambios en el *pattern de la expresión génica*.

La asociación de las Ciencias Omicas a las Ambientales, es considerada como una nueva perspectiva que permite la interpretación y comprensión molecular precisas de las perturbaciones que ocurren en los ámbitos ecológicos, especialmente las antrópicas. Además, la información lograda por estas herramientas puede incorporarse a la evaluación de riesgos asociados a tóxicos de diferente naturaleza y será de interés por su aplicación en el diseño de normas regulatorias ambientales.

Del estudio de genes individuales, ARN_m y proteínas simples o metabolitos aislados, se pasó a considerar unidades más complejas (como los genomas, transcriptomas, proteomas y metabolomas), en un proceso que también se enriqueció con el aporte de otras Ciencias pre-existentes,. Ello había sido anticipado como un subproducto inicial de la elucidación de la estructura del ADN, dando paso a la posibilidad de caracterización molecular completa de otros genomas en una variedad de organismos (bacterias, plantas, insectos, nematodos, anfibios, peces, etc.).

“Genómica” es un término complejo que agrupa a numerosas disciplinas científicas y tecnológicas; se ocupa del mapeo, secuenciación, análisis e interacción de las funciones de genomas completos. Reúne dos grandes áreas que contribuyeron a la comprensión de los complejos mecanismos subcelulares involucrados en procesos básicos organizados en un sistema integrado: a) la *Genómica Estructural*, orientada a la descripción de la arquitectura espacial de cada proteína codificada, a la caracterización secuencial completa del ADN de genomas individuales o de las organelas de un organismo o y a la determinación de la ubicación de los genes secuenciados en diferentes cromosomas y, b) la *Genómica Funcional* que se ocupa de sistematizar la información sobre las funciones de los genes (de gran importancia pues las respuestas toxicológicas son mayormente funcionales).

Los objetivos de la Genómica Funcional se ordenan en tres niveles, campos de análisis o áreas: a) *Transcriptómica* en la formación del total de los ARN_m (o *transcriptoma*) de una población celular o tisular, órgano u organismo, que *traslada la información genética a proteínas*; b) *Proteómica*, que se ocupa del estudio del conjunto de las proteínas celulares o extracelulares (*proteoma*) expresadas por un genoma completo, permitiendo la selección de aquellas cuya abundancia relativa es cambiante en el tiempo (por ejemplo, durante el desarrollo, o en su respuesta a diferentes estímulos y condiciones ambientales) y, en el caso de proteínas específicas, al ocurrir alteraciones en su secuencia de aminoácidos. Se trata de efectos directos de los cambios en la expresión de los ARN_m y, c) *Metabolómica*, brinda información multiparamétrica que permite conocer el estado metabólico funcional global o fisiológico (bioquímico y molecular) de células, tejidos y órganos de un organismo, en un ambiente particular. Aporta a la caracterización y análisis cuantitativo de los productos de los procesos metabólicos involucrados en las reacciones biológicas básicas requeridas para el crecimiento, mantenimiento y funcionalismo normal (metabolitos orgánicos o inorgánicos de bajo peso molecular o *metaboloma*), como consecuencia de las interacciones funcionales del ARN_m y de las proteínas (esto es, de la Transcriptómica y la Proteómica); además determina los perfiles de sus abundancias en biofluidos (orina y sangre). El metaboloma incluye compuestos polares (aminoácidos, péptidos de bajo peso molecular), moléculas no polares y compuestos inorgánicos. La *Lipidómica* es un subcomponente del metaboloma descriptor del perfil completo de lípidos en un sistema particular; es afectado por los cambios en las concentraciones de los lípidos celulares o tisulares que pueden ocurrir como consecuencia de las exposiciones ambientales a tóxicos.

Epigenética - Epigenómica. Las primeras menciones de la Epigenética datan de mediados del siglo XIX. Los efectos epigenéticos de los tóxicos son cambios hereditarios en la expresión génica, causados por influencias ambientales y mecanismos diferentes a los que pueden registrarse en la secuencia del ADN (por ejemplo, metilación y acetilación), que afectan el plegamiento de los cromosomas y la accesibilidad de los genes (en los procesos de transcripción). Una especie de memoria celular no genética de estrés tóxico ambiental.

Las alteraciones epigenéticas en períodos críticos del desarrollo temprano pueden a) ser de carácter crónico afectando, a largo plazo, la viabilidad de las poblaciones, y b) actuar como sensores de estrés ambiental y, c) interferir en los procesos evolutivos a través de cambios fenotípicos.

Ciencias Omicas - Toxicogenómica.

La Toxicogenómica es una disciplina emergente del encuentro de las Tecnologías Omicas y los *endpoints* de la Toxicología, favoreciendo el desarrollo de un conocimiento más preciso de los eventos y mecanismos de toxicidad, superando así la condición limitada de la Toxicología a la descripción del impacto de los tóxicos sobre la expresión de los genes. La Toxicogenómica se identifica como una *subdisciplina de la Toxicología* por aportar información más detallada y predictiva sobre secuencias y funciones de cada uno de los sectores

del genoma, en diferentes momentos del desarrollo de la especie considerada y/o de las cambiantes condiciones de entorno ambiental.

El término “toxicogenómica” fue generado en 1999 para indicar las informaciones integradas provistas por la *Toxicología* y por la *Genómica Funcional*, esto es, el conocimiento de los impactos adversos de los tóxicos sobre la expresión de los genes involucrados en las respuestas adaptativas asociadas a dichos efectos. Esta asociación estimuló el desarrollo de un conocimiento más profundo de los mecanismos de toxicidad que permitió: a) conocer genes susceptibles de daño, b) detectar patrones y mecanismos de toxicidad, c) identificar moléculas endógenas sensibles a los daños provocados por los tóxicos, d) la expresión de genes aptos como biomarcadores de exposición y riesgo, y e) el rastreo y monitoreo de biomarcadores de efecto temprano y de susceptibilidad.

La Toxicogenómica es considerada como una disciplina basada en una comprensión más profunda de los mecanismos clásicos de la Toxicología; este enfoque la identifica como *Toxicología de Sistemas*, que integra las respuestas globales de un organismo desde el nivel de genotipo (o sea, la información transcriptómica, proteómica, metabolómica) al de fenotipo.

No obstante lo antedicho referente a las ventajas de la Toxicogenómica, hay aspectos de ella aún no resueltos como la reproductibilidad, variabilidad e interpretación de los resultados; los biomarcadores genómicos pueden verse afectados por variaciones de diverso tipo y origen (por ejemplo, los estacionales). Además, en los eventos toxicológicos ambientales se debe tener en cuenta que los tóxicos no se mantienen “puros”, sino que se integran a mezclas complejas pre-existentes, que son inestables o variables en función de factores de diversa índole y origen y así perturbar los *endpoints* y su utilidad en decisiones vinculadas a la temática de normas regulatorias ambientales.

Toxicogenómica y Bioinformática.

Cabe señalar que en forma concomitante con los avances mencionados precedentemente, se registró el explosivo desarrollo de nuevas, poderosas y sofisticadas herramientas informáticas para almacenar, analizar e interpretar la masa de datos numéricos emergentes desde las Ciencias Omicas y sus vínculos, que confluyeron en la *Era de la Bioinformática*; las mismas fueron rápidamente adoptadas por la Toxicogenómica.

Algunos autores entienden a la Bioinformática como un integrante adicional de las Tecnologías Omicas que no debiera ser considerado en forma aislada. La Toxicogenómica y la Bioinformática, devinieron en valiosas herramientas para la Biología y la Bioquímica promoviendo notables avances en el estudio de las interacciones entre genes y ambientes; además, la Bioinformática, mediante modernas técnicas de la Biología Computacional aporta a la colecta, ordenamiento, manejo, análisis e interpretación integrada de conjuntos de datos numéricos y biológicos experimentales. También contribuye a la confiabilidad y reproductibilidad de la información para el diseño de modelos predictivos.

En paralelo a los de la Bioinformática, se registran otros avances como los secuenciadores automatizados junto a los aportes tecnológicos provistos por las Ingenierías que también se incorporaron a la investigación toxicológica. Para entender la relevancia de la Bioinformática cabe recordar lo siguiente: el transcriptoma humano está conformado por 30.000 genes, el proteoma puede tener 100.000 (o más) proteínas y el metaboloma 2.000-20.000 componentes.

Toxicogenómica y Ecotoxicología - Ecotoxicogenómica.

Los protocolos estandarizados para bioensayos ecotoxicológicos en laboratorio procuran información sobre diversas respuestas de los individuos test (mortalidad, crecimiento, reproducción, etc.) en concentraciones constantes, con *endpoints* que brindan limitado detalle referido a los mecanismos de toxicidad, recurriendo a parámetros indicadores de carácter fenomenológico (LC50, NOEL, LOEC, etc.).

La integración de la Toxicogenómica a la Ecotoxicología dio paso a la *Ecotoxicogenómica* que estudia la expresión génica y proteica en organismos *non-target* expuestos a tóxicos ambientales en modelos “fuera” del laboratorio, tanto a nivel individual como sobre la estructura y dinámica de los ecosistemas; es considerada como una nueva alternativa que permitirá una comprensión e interpretación molecular más precisa de las diversas perturbaciones que ocurren en los ámbitos ecológicos, especialmente las antrópicas,

El vínculo que permitió asociar a las Omicas con los *endpoints* de la Ecotoxicología permitió alcanzar información complementaria acerca de la manera en que las células o los organismos responden a un estímulo ambiental particular. Así la Ecotoxicogenómica puede contribuir a una comprensión más profunda y a la detección precoz de efectos adversos. Se caracteriza por ser especialmente sensible por sus respuestas más tempranas que las celulares o tisulares ya que preceden a las que tradicionalmente se describen que ocurren en células y tejidos de organismos test (por ejemplo, producción de huevos, índice gonadosomático o fecundidad).

El conocimiento de las interacciones genes-ambiente y las respectivas respuestas que se alcanzan como subproductos de la integración de las Omicas, se caracteriza por ser más informativa, discriminadora y predictiva que las tradicionales. Adicionalmente, esta nueva disciplina se incorpora paulatinamente al catálogo de métodos de análisis cuantitativo de riesgos (ambientales y sanitarios).

Es pertinente a este tema la advertencia que formuló un grupo de científicos europeos que informaron sobre el *PEER Network* (“*Partnership for European Environmental Research*”) que involucra a investigadores de las Ciencias Biológicas en diferentes niveles de complejidad ambiental e intenta integrar a las Ciencias Ecológicas con las Humanísticas en el ámbito-marco de la Ecotoxicología, mediante la generación de información para *los policymakers* que evalúan riesgo ambiental, industrial y la social. La propuesta indica que para la evaluación de esos riesgos asociados a sustancias químicas debe adoptarse una metodología basada en un modelo ecológico antes que toxicológico; afirma que la metodología de la Ecotoxicología clásica, (la de adoptar los *tests* de toxicidad con individuos de especies test) no puede seguir vigente.

Es también interesante la reciente propuesta de un marco conceptual de carácter integrador identificado como los *Adverse Outcome Pathways* (AOP), que incorpora e integra en su análisis cambios de otros parámetros bióticos y ambientales que pueden ocurrir en los eventos ecotoxicológicos, tales como los térmicos, metabólicos, estructurales, ritmicidad ambiental (duración del día o de las estaciones, duración de las exposiciones), homeostáticos o comportamentales, que afectarían a las poblaciones de diferentes especies coexistentes en un sector ambiental particular, que se hallan en contacto crónico con tóxicos pudiendo afectar selectivamente la sobrevivencia, crecimiento, reproducción, adaptación u otros parámetros indicadores de toxicidad relevantes analizados por la Toxicogenómica. De la misma forma se advierte que los cambios en los factores abióticos de cada hábitat como la salinidad y el pH, con el agravante de que los cambios suelen ser rápidos, sin permitir cambios transcripcionales y traslacionales.

CONFERENCIAS

I.- ¿UN CLARO EN EL ARDUO CAMINO UTÓPICO HACIA LA “HUELLA DIGITAL” DEL IMPACTO?

Prof. Dr. Andrés Venturino.

CITAAC - UN Comahue – CONICET.

La búsqueda de biomarcadores sensibles y tempranos de la acción tóxica de un contaminante sobre los organismos ha llevado a profundizar en el campo de los mecanismos moleculares de señalización, impacto y respuesta. Al pretender agregar especificidad lo más unívoca posible, el camino se complejiza notoriamente ante la cantidad exponencial de “diálogos cruzados” entre vías de señalización y respuesta en factores regulatorios de la expresión génica. Súmese a este panorama el hecho de que la ecotoxicología como base del monitoreo ambiental tiene como actores privilegiados a las especies autóctonas, las cuales presentan particularidades frente a aquellas consideradas especies “modelo”. En nuestro historial como grupo del LIBIQUIMA (actualmente en CITAAC) que estudia la ecotoxicidad de agroquímicos e hidrocarburos en especies acuáticas, hemos ido profundizando este camino desde los blancos primarios clásicos hasta vías de señalización y moléculas regulatorias de la respuesta. Varios ejemplos nos permiten corroborar la mayor sensibilidad y precocidad de algunos marcadores moleculares de toxicidad, incluso frente a respuestas horméticas de biomarcadores clásicos como las colinesterasas. No obstante, encontramos también una importante cantidad de baches, fundamentalmente desde el aspecto técnico, al querer aplicar estudios con moléculas, por ejemplo anticuerpos, sondas y cebadores, que se han desarrollado para los organismos modelo. El empleo de la transcriptómica ha abierto una nueva ventana hacia la anotación de genes y el desarrollo de moléculas apropiadas para las especies acuáticas objeto de nuestros estudios.

Andrés Venturino es Bioquímico egresado de FFyB-UBA y Doctor de la UBA en Bioquímica área Biología Celular. Investigador Principal de CONICET y Profesor Asociado de la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Comahue (UNCo), dirige un grupo consolidado de investigación en el área de Bioquímica Toxicológica y Toxicología Ambiental desde el 2000, orientado a los mecanismos de acción y efecto de plaguicidas, hidrocarburos y otros contaminantes en biota acuática, dentro del LIBIQUIMA-UNCo. Entre sus acciones de gestión en CyT a nivel local, llevó adelante la creación del Instituto de Biotecnología Agropecuaria del Comahue en la UNCo, y la posterior asociación con el LIBIQUIMA para dar lugar a la creación del Centro de Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue como Unidad Ejecutora de bipertenencia UNCo-CONICET, del cual es actualmente su Director. Ha participado activamente en la formación de RRHH en investigación, con 5 doctorados y 3 magister, co/dirigiendo actualmente 6 doctorados. Ha publicado 45 trabajos en revistas de alcance internacional, 13 en los últimos 5 años, mayormente en el área de biomarcadores bioquímicos y moleculares de efecto de plaguicidas en modelos de desarrollo en anfibios, en colaboración en cultivos celulares tumorales mamarios y evaluación de riesgo ambiental entre otros, en revistas especializadas como *Pesticide Biochemistry and Physiology* (101: 240-247, 2011; 119:48-53, 2015), *Environmental Toxicology and Chemistry* (31: 2052-2058 y 2311-2317, 2012; 34:1009-1014, 2015), *Toxicology Letters* (213: 184-193, 2012), *Chemosphere* (120:343–350, 2015) y *Environmental Toxicology and Pharmacology* (39:525-535, 2015). Es miembro activo de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), miembro titular de la Asociación Toxicológica Argentina (ATA) y miembro de Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).

II.- LA ERA “ÓMICA” EN ESPECIES NO MODELO. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO PARA EL DESARROLLO DE BIOMARCADORES.

Prof. Dr. Danilo Ceschin.

CITAAC - UN Comahue – CONICET.

El emergente campo transdisciplinar de la Toxicogenómica tiene como objetivo la combinación de enfoques a gran escala para estudiar las respuestas de los organismos frente a un tóxico a nivel del genoma, transcriptoma y por transición al proteoma y metaboloma, entre otros. Esta visión global de la expresión de genes y de proteínas causada por la exposición a tóxicos y la acumulación de ciertos metabolitos, contribuyen a la identificación de componentes celulares, vías de señalización, mecanismos novedades de acción y de respuesta en un organismo o sistema de estudio. Partiendo del estudio a nivel ómico, es posible identificar y profundizar exhaustivamente efectos bioquímicos y metabólicos más relevantes utilizando herramientas “clásicas”.

La evaluación del impacto de agroquímicos y otros tóxicos ambientales generados por la acción antrópica requiere la inclusión de estudios de efectos sobre especies autóctonas. Es sabido que existen respuestas bioquímicas y moleculares que se manifiestan en rangos de concentración de un tóxico muy por debajo de aquellos que provocan alteraciones fisiológicas y efectos letales. Determinar cuáles son los mecanismos de acción y respuesta puede constituirse en biomarcadores sensibles y tempranos de la exposición a tóxicos. Sin embargo, el biomonitorio mediante especies autóctonas demuestra ser una tarea ardua ante la falta de conocimiento de sus genomas y del desarrollo de herramientas de análisis tales como anticuerpos específicos que reaccionen en estas especies. Nuestra experiencia en el estudio de biomarcadores de ecotoxicidad de plaguicidas y metales tóxicos en el desarrollo del sapo sudamericano *Rhinella arenarum*, abunda en ejemplos sobre las dificultades crecientes a la hora de encontrar anticuerpos para enzimas, factores de transcripción y proteínas involucradas en vías de señalización, o para diseñar sondas utilizadas en diferentes técnicas (hibridación *in situ*, *northern blot*, RT-qPCR). Sin desmérito de ello, el abordaje desde el estudio transcriptómico nos ha permitido recientemente contar en un tiempo sensiblemente menor con un enorme conjunto de información sobre la expresión diferencial frente a la exposición a distintos plaguicidas organofosforados. Si bien nos resta realizar gran parte de análisis bioinformático, podemos ya determinar que existen patrones específicos para cada tóxico en función del tiempo de exposición y anotar algunos genes particularmente sensibles de forma preliminar, a través de la comparación con genomas y transcriptomas conocidos en especies modelo. Entre nuestros objetivos inmediatos actuales, estamos contrastando resultados obtenidos por el abordaje clásico con los datos de transcriptómica, y determinando nuevos potenciales biomarcadores en cuanto a su identificación, anotación y validación por métodos clásicos. También esperamos ampliar nuestros estudios de transcriptómica con otros contaminantes como metales tóxicos e hidrocarburos, y comparar las respuestas en dos regiones geográficas diferentes.

Desde esta perspectiva, pretendemos a futuro encarar estudios a nivel transcriptómico en otras especies nativas de la región del Comahue. En un proyecto más ambicioso y de mayor escala, queremos presentar SEMBrAr (**Secuenciación Masiva de la Biota Autóctona**). SEMBrAr está pensado como un consorcio multidisciplinario con el doble propósito de formar investigadores en el área de la toxicogenómica y bioinformática, y de obtener secuencias de referencia (genoma/transcriptoma) para especies no modelo de la biota autóctona que luego serán compartidas con la comunidad científica. Concisamente, los datos individuales obtenidos comparados con los accesibles en diversos repositorios para datos a gran escala permitirán incrementar significativamente la comprensión de mecanismos moleculares que subyacen a los procesos fisiopatológicos de la exposición a contaminantes.

Danilo Ceschin es Bioquímico y Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Posee una amplia formación en técnicas de biología celular y molecular obtenidas en su formación de doctorado. También, ha desarrollado una actividad de docencia con contenidos relacionados con la bioestadística y el control de calidad (Auditor norma ISO17025), tanto a nivel de grado en la carrera de Bioquímica de la UNC, como de posgrado, asesorando en programas de control de calidad del Colegio de Bioquímicos de Córdoba y dictando cursos y conferencias al respecto. Además, durante su trabajo Pos-Doctoral, adquirió competencias en bioinformática en el área de la genómica, realizando análisis de datos a gran escala provenientes de microarreglos de genes y explorando patrones de expresión de genes que pueden predecir diferentes comportamientos celulares (Pavet et al, Cell Death and Disease. 2014 (1). <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.5>); participando en el desarrollo de herramientas de control de calidad para evaluar perfiles de datos obtenidos por secuenciación masiva de ADN o ARN (Mendoza-Parra et al., Nucleic Acids Res. 2013 Sep 14. doi:10.1093/nar/gkt829); e integrando datos provenientes de microarreglos con datos de secuenciación masiva para estudiar el papel de cofactores y factores de transcripción en la activación de diferentes vías de señalización (Ceschin et al., Genes Dev. 2011 Jun 1;25(11):1132-4.doi: 10.1101/gad.619211). En la actualidad es miembro de la Carrera del Investigador Científico en la categoría de asistente desempeñando sus tareas en el CITAAC (Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue) direccionadas a la generación y análisis masivo de datos para su evaluación bioinformática aplicada específicamente a la toxicogenómica, promoviendo el desarrollo de temas estratégicos para CONICET a la vez que permitiendo la apertura y conformación de nuevos RRHH en una línea de muy alta actualidad.

IDENTIFICATION OF MOLECULAR BIOMARKERS OF EXPOSURE TO CONTAMINANTS IN AQUATIC ORGANISMS.

Prof. Dr. Afonso CD Bainy.

Lab. Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), NEPAQ.

Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil 88034-257.

Email afonso.bainy@ufsc.br

Among the main causes of the coastal contamination around the world are the discharges of untreated sanitary sewage and petroleum derived compounds, which has chronically affected the health of aquatic organisms. In view of the ecologic and economic importance of coastal areas, understanding the effects of contaminants upon organisms can help to assess the actual impact of bioavailable compounds in the environment. For biomonitoring programs, different animals have been proposed as sentinels, most of them being non-model organisms, with very little information about genomic and transcriptomic data. At global level, a growing effort have been observed to increase the knowledge about omics data in native and introduced species in the environment. In Santa Catarina, south of Brazil, our research group have dedicated more attention to mollusk bivalves, due to their ecologic and economic importance to the local economy. Studies have been carried out in the oysters *Crassostrea brasiliiana* (gasar), *Crassostrea gigas*, *Crassostrea rhizophorae*, in the scallops *Nodipecten nodosus* and in the mussel *Perna perna* exposed to contaminants under controlled laboratory conditions or through in situ biomonitoring experiments using organisms kept close to sanitary sewage or petroleum contaminated discharge sites. Using molecular techniques (suppressive subtractive hybridization, RNAseq, qPCR) we have identified some Phase I and II of biotransformation of xenobiotics coding genes as potential molecular biomarkers of exposure in coastal ecosystems. Likewise, other genes related to fatty acid metabolism has shown interesting and promising results. The molecular responses observed in the exposed organisms were associated to the actual levels of bioaccumulated contaminants. We suggest that these early warning molecular tools as complementary techniques to assess and monitor the actual impact of contaminants in aquatic sites. Supported by CNPq, INCT-TA, Petrobras.

Afonso C D Bainy graduated in Biological Oceanography by the Federal University of Rio Grande (FURG) in 1986, completed Masters in Biological Sciences (Biochemistry) Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) in 1990 and completed his Ph.D. in Biological Sciences (Biochemistry) University São Paulo (USP) in 1995. In 2002, carried out a post-doctoral training at the Biology Department of the Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA, USA. Since 1993, he is Professor in the Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina. He is currently Associate Professor and created, in 1997, the Laboratory for Biomarkers of Aquatic Contamination and Immunochemistry, where develops most of its research projects. He is coordinator of the research group registered in CNPq entitled "Biochemical and molecular defenses systems in aquatic organisms". He published 87 articles in scientific journals and 7 book chapters, participated in scientific or organizing committees of 22 national and international scientific events. In particular, in October 2004 chaired the Organizing Committee of the **VIII Brazilian Congress of Ecotoxicology**, held in Florianópolis, SC, and in May 2007, chaired the **14th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms** (PRIMO 14). Has advised 80 people between postdocs, PhD and masters graduates IC and TCCs. Coordinated several research projects and is currently coordinating one research project in this same area, with emphasis on the development of new biomarkers of aquatic contamination and adaptive systems of aquatic organisms to environmental contamination. Also, participate as Vice-Coordinator of the National Institute of Science and Technology, Aquatic Toxicology, headquartered in FURG. Presently is participating in cooperation studies with Petrobras, aiming the development of new biomarkers of exposure to petroleum industry. Also, his research group belongs to the EMBRAPII-REMAS Environmental Biotechnology group.

IMPORTANCIA DE LAS RELACIONES JERARQUICAS EN LA INTERPRETACION DE DATOS ECOTOXICOLOGICOS.

Prof. Dra. Alicia E. Ronco.

Centro de Investigaciones del Medio Ambiente, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
cima@quimica.unlp.edu.ar

Desde las primeras definiciones que nos trajo la disciplina Ecotoxicología en la década del 70, que reunían conceptos y métodos propios de la toxicología y de la ecología, se produjo un proceso evolutivo en el enfoque de estudios propios y sus alcances. Los elementos revolucionarios proporcionados por R. Carsen en 1962 permitieron extrapolar efectos desde nivel de organismos a efectos sobre el ecosistema y el balance de la naturaleza. Se encaminaron estrategias de investigación y extrapolación en la búsqueda de respuestas a observaciones ocurridas en ecosistemas producto de exposición a tóxicos ambientales, en una etapa retrospectiva de análisis. Las herramientas bioanalíticas predictivas se iniciaron vía la estrategia del bioensayo de toxicidad de laboratorio (macro y microbioensayos), con métodos estandarizados, de utilidad y presente aplicación en diversas áreas del diagnóstico ambiental, seguido del uso de baterías de pruebas, integrando organismos representativos, mayoritariamente del medio acuático. Paralelamente, las investigaciones se orientaron al análisis de criterios de extrapolación y la aplicación de factores de seguridad en la elaboración de niveles de guía calidad y referenciales de aceptabilidad. El desarrollo del diagnóstico bioquímico a nivel individual o sub-individual permitió y permite conocer mecanismos para evaluar respuestas a la exposición, a los efectos o a la susceptibilidad a los tóxicos, con capacidad para anticipar señales tempranas sobre la presencia de contaminantes en el ambiente. El progreso en el campo de la genómica ha comenzado a proveer nuevas herramientas para comprender como los compuestos químicos pueden impactar la salud humana y del ecosistema, siendo el desafío actual y futuro de la ecotoxicología conocer los mecanismos de toxicidad sobre la vida silvestre. Gran parte de los métodos estandarizados para evaluar el impacto potencial de los tóxicos se basa en medir respuestas del organismo sobre indicadores sensibles, a concentraciones constantes y definidas, derivados sobre la base puntos finales. Esta aproximación fenomenológica es útil para identificar compuestos de potencial preocupación, pero provee poca comprensión sobre los mecanismos de toxicidad. Sin esta comprensión será difícil responder preguntas claves que tiene en la actualidad la ecotoxicología, tales como predecir las respuestas tóxicas a través de un amplio grupo de organismos con diversidad filogenética y estimar como los cambios a un nivel de organización puede afectar otros niveles, predecir la influencia de la variación de la exposición con el tiempo sobre la respuesta. La ecotoxicología es una ciencia jerárquica, bajo un esquema no fijo encadenado causa-efecto-significancia, aplicable a estos sistemas tanto en un contexto desde abajo hacia arriba como desde arriba hacia abajo. ¿Cómo se traducen los mecanismos de un determinado nivel en efectos a otro nivel? Recién en las últimas décadas se ha logrado alguna tendencia en este sentido.

RONCO, Alicia Estela es Doctor en Ciencias Naturales (Orientación Geoquímica). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata; Licenciada en Geoquímica, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.

Actualmente es Miembro de la Carrera del Investigador CONICET; Directora del Centro de Investigaciones del Medio Ambiente dependiente del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; Profesora Asociada Ordinaria, Licenciatura en Química y Tecnología Ambiental, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; - Coordinadora de la Comisión Específica de la Licenciatura en Química y Tecnología Ambiental, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; Integrante de la Comisión Asesora Ciencias Biológicas, Ambiente y Salud, CIC Prov. de Buenos Aires

Especialidad: estudios relacionados con la contaminación ambiental, química ambiental, ecotoxicología, evaluación de riesgos ambientales, estrategias de diagnóstico y mitigación.

Dirige proyectos de investigación en temas relacionados con la química ambiental, contaminación ambiental, ecotoxicología, evaluación de riesgos, con financiamiento de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, del CONICET, de la UNLP, de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Ministerio de Salud de Nación, y en el marco de convenios específicos.

Es autora de más de 170 trabajos en revistas científicas internacionales o regionales y alrededor de 300 comunicaciones en reuniones científicas, congresos o simposios en temas relacionados a dichos proyectos.

Ha dirigido o dirige investigadores y profesionales de apoyo (9), becarios y tesis doctorales (26, 18 finalizadas, 7 en curso) y de maestría y trabajos finales (13) y más de 100 pasantes estudiantes de bioquímica, química, ciencias naturales, ingeniería en la UNLP.

Realizó y realiza trabajos de extensión universitarias a través de servicios a terceros y asesorías a organismos nacionales, provinciales, municipios, convenios de servicios a industrias, organismos de gestión nacionales, provinciales, municipales desarrollados en el CIMA; ha actuado en representación de la FCE-UNLP como Perito Oficial, en causas originadas en problemas de contaminación ambiental en juzgados nacionales y provinciales.

Intervino en comisiones asesoras, evaluadoras, comités científicos de CONICET, CIC, UNLP, ANPCyT, CIN, INTA, de simposios o congresos, comités editoriales de revistas internacionales, etc.

PRESENTACION JOVENES INVESTIGADORES

Las poliaminas como biomarcadores de efecto de plaguicidas en el desarrollo de anfibios.

Lascano, Cecilia Inés^{1,2}; Pires, Natalia Susana¹;Ceschin, Danilo Guillermo^{1,3};Venturino, Andrés^{1,2}.

¹CITAAC, Univ. Nac. del Comahue –CONICET– Neuquén. ²Facultad de Cs. Agrarias, UNComahue.³Facultad de Cs. Médicas, UNComahue. e-mail: cecilia.lascano@faca.uncoma.edu.ar

La Patagonia Norte es la principal región productora de peras y manzanas del país, donde el organofosforado metilazinfos (MA) ha sido aplicado en grandes cantidades y detectado en aguas de la zona a concentraciones que exceden el criterio de protección de la vida acuática. El sapo *Rhinella arenarum* habita dicha región y su desarrollo embrionario y larval ocurre en cuerpos de agua de la zona. Debido a que las poliaminas (PA) son indispensables para el desarrollo embrionario, es nuestro objetivo analizar de qué manera se altera su metabolismo en embriones de sapo expuestos a MA. La exposición a MA produjo un incremento en el número de embriones malformados, en la actividad de ornitina decarboxilasa y en los niveles de putrescina, mientras que espermidina y espermina disminuyeron. Se analizó la degradación oxidativa de PA, durante la que se generan especies reactivas que podrían contribuir al estrés oxidativo observado en embriones expuestos a MA. La actividad de las enzimas degradativas se incrementó en embriones expuestos a MA. Además, el análisis transcriptómico reveló la alteración de la expresión de genes del metabolismo de PA. Nuestros resultados demuestran que el metabolismo de PA está afectado por la exposición a organofosforados, contribuyendo al estrés oxidativo mencionado, y que los parámetros analizados serían potencialmente utilizables como biomarcadores de efecto.

Efecto del glifosato y el clorpirifos sobre la actividad de acetilcolinesterasa en *Cnesterodon decemmaculatus*. Ensayos *in vivo* e *in vitro*.

Daissy Bernal-Rey¹, Renata Menéndez-Helman^{1*}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE, CONICET-UBA). Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQIBICEN, CONICET-UBA). Buenos Aires, Argentina.* e-mail: rmenendez@qi.fcen.uba.ar

En Argentina, con la expansión de la frontera agrícola aumentó la aplicación de plaguicidas. En particular, el herbicida glifosato [N- (fosfonometil) glicina; PMG] y el insecticida clorpirifos [O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato, CPF] son ampliamente utilizados. En el presente trabajo se evaluó el efecto de estos plaguicidas sobre la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE, biomarcador de neurotoxicidad) en un teleosteo nativo (*Cnesterodon decemmaculatus*) mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*. Se realizaron bioensayos semi-estáticos de toxicidad aguda bajo condiciones controladas de temperatura (23.0 ± 0.5 °C) y fotoperíodo (12L:12O), utilizando concentraciones subletales de CPF y de PMG y manteniendo un grupo como control. La actividad de AChE se determinó en los homogenatos de la sección anterior de los peces. La exposición aguda (96h) a PMG produjo una inhibición estadísticamente significativa del 22% y 28% para 1 y 10 mg PMG $\times$ L⁻¹ respectivamente. Por su parte la exposición a 1 y 5 μ g CPF $\times$ L⁻¹ produjo una mayor inhibición de la actividad de AChE, estadísticamente significativa, del 48% y 69% respectivamente. En los ensayos *in vitro* se determinó un patrón de inhibición para CPF (25 - 200 mg $\times$ L⁻¹) pero no se observó inhibición por PMG (0,425 - 3,4 g $\times$ L⁻¹), sugiriendo que sólo CPF presenta un mecanismo de inhibición directo sobre la enzima.

***Deschampsia antarctica* como organismo centinela de contaminación.**

Dopchiz LP^{1,2}, Di Fonzo CI¹, Ansaldo M^{1,2}

¹Dpto. de Ecofisiología y Ecotoxicología. Instituto Antártico Argentino. Dirección Nacional del Antártico. Ministerio de Relaciones Exteriores y Culto de la República Argentina. ²Dpto de Biología. Universidad Argentina J. F. Kennedy.

Deschampsia antarctica es la única gramínea nativa descripta hasta el presente en Antártida. Las estaciones científicas generan fuentes puntuales de contaminación como, por ejemplo, derrames accidentales de hidrocarburos. En el presente trabajo se realizó la evaluación de *D. antarctica* como organismo centinela. Con éste fin se muestrearon zonas cerca y lejos de la estación científica Carlini (península Potter, Isla 25 de Mayo). Plantas completas fueron fijadas en alcohol 70%. Los ápices meristemáticos fueron usados para determinar ocurrencia de anomalías en la mitosis y calcular el índice mitótico. No se encontró división mitótica en las muestras del área prístina (control). Las muestras tomadas de los sitios próximos a las cisternas de combustible, generador eléctrico y “capilla” presentaron valores de IM=10,46, 10,22 y 8,46, respectivamente. Además, presentaron anomalías mitóticas como profases descondensadas, metafases desorganizadas y con cromosomas fuera de placa, anafases con puentes, anafases y telofases diagonales. No se registraron micronúcleos. La presencia de contaminantes en los puntos seleccionados se evidencia por efectos aneugénicos y clastogénicos espontáneos. Esta información, sumada a nuestros trabajos en desarrollo, determinarán si *D. antarctica* resulta útil como centinela para el biomonitoreo del ecosistema terrestre antártico.

Efectos de dos contaminantes sobre la natación de *Cnesterodon decemmaculatus*.

Eissa B.L.¹, Ferro J.P.¹, Ossana N.A.^{1,2}, González Núñez A.A.^{1,3}, Ferrari L.^{1,3}.

¹ Depto. Cs. Básicas, PRODEA - (INEDES/CONICET), UNLuján; ² CONICET; ³ CIC-Prov. Bs. As.

La alteración de patrones comportamentales causados por la exposición a poluentes puede plantear un riesgo serio en el éxito de las poblaciones de peces.

Se realizaron ensayos de 12 días, con renovación de los medios cada 4 días con temperatura y fotoperiodo controlados (22°C, 16hL:8hO) y aireación permanente. Los peces fueron aclimatados en agua potable (AP) durante 7-10 días y alimentados *ad libitum*; durante los ensayos fueron alimentados con el 2 % de su masa corporal. Se utilizaron 10 adultos de ambos sexos por cada uno de los tratamientos: 1) Control en AP; 2) 0,1 ppm Ibuprofeno (IBU); 3) 0,5 ppm Cd²⁺ (como Cl⁻). Los parámetros fisicoquímicos de los medios y las concentraciones (subletales) de IBU y Cd se controlaron diariamente.

Mediante el software LoliTrack se evaluaron los siguientes parámetros de los peces: Velocidad (V; mm.s⁻¹), Aceleración (A; mm.s⁻²), Tiempo Activo (TA; s y %), Tiempo Inactivo (TI; s y %) y Distancia recorrida (D; mm).

El Programa permite contrastar al individuo respecto del medio que lo rodea. Al identificar el individuo, y mediante la comparación de los cuadros que componen el video, calcula los parámetros relacionados al movimiento. El procedimiento seguido para la obtención de las filmaciones y su posterior análisis consta de tres etapas: a) Preparación del set de filmación, b) Preparación de los animales y filmación, c) Edición y Análisis con LoliTrack V3.

En los peces expuestos a IBU y Cd²⁺ se registraron diferencias significativas respecto de los controles en la V y la D.

Evaluaciones genotóxicas de ambientes acuáticos y tóxicos de referencia utilizando un pez nativo.

Ossana NA^{1,2}, Gonzalez Nuñez AA^{1,3}, Eissa BL¹, Ferrari L^{1,3}

¹ PRODEA DCB (INEDES-UNLu-CONICET); ² CONICET; ³ CIC-Prov Bs As

Se evaluó el efecto genotóxico en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a agua del río reconquista, Ibuprofeno o Cadmio mediante el *test* de micronucleos (MN), el ensayo cometa (EC) y aberraciones nucleares (AN).

Se realizaron exposiciones de 12 días en condiciones controladas de laboratorio, (22±1°C, 16Luz:8Oscuridad, aireación permanente), con renovación del medio cada 4 días. Los peces fueron aclimatados durante 7-10 días y alimentados *ad libitum*. Se utilizaron 10 adultos de ambos sexos por tratamiento: [1] CN-control negativo, [2] 5 ppm Ciclofosfamida (CP-control positivo), [3] 0.1 ppm Ibuprofeno (IBU), [4] agua río Reconquista (RR), [5] 0.5 ppm Cadmio (Cd). Diariamente se controlaron los parámetros fisicoquímicos y la concentración de IBU y Cd.

Al finalizar la exposición los animales se anestesiaron en frío y se les extrajo sangre. Para MN se cuantificaron en 1500 eritrocitos la frecuencia de micronúcleos (MN) y aberraciones nucleares (AN) como: doble núcleos, escotaduras y *buds* nucleares. Para el EC las células se lisaron, se realizó la corrida electroforética y se calculó en 100 células el IDG (Índice de Daño Genómico) y el porcentaje de células con daño (grado II a IV).

En IBU aumento la frecuencia de MN, AN, IDG y células con daño III-IV; el Cd aumento el IDG y la muestra RR aumento el IDG y células con daño II-III; La CP también aumentó respecto al CN.

PREMIOS

PREMIOS 2016

Premio Agustín Marenzi al trabajo “El aluminio inhibe a las Ca^{2+} ATPasas de membrana plasmática y de retículo sarcoplásmico por mecanismos diferentes” presentado por Marilina de Sautu, Nicolás Saffioti, Mariela Ferreira Gomes e Irene Mangialavori. c

Premio Alfredo Bandoni al trabajo “Estafietina y derivados semisintéticos: evaluación de sus efectos sobre *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp. y células de melanoma”, presentado por Valeria P. Sülsen, Emilio Lizarraga, Silvia I. Cazorla, Augusto E. Bivona, Natacha Cerny, Renzo Martino y César A. N. Catalán. (Anexo VI)

Asimismo resolvió adjudicar una Mención al Premio María A. Enero al trabajo “Estudio de unión de un ligando con propiedades alostéricas para el receptor nicotínico”, presentado por Carlos H. Paván. Se declara desierto el Premio Francisco Cignoli.

EL ALUMINIO INHIBE A LAS Ca^{2+} -ATPASAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO POR MECANISMOS DIFERENTES

Marilina de Sautu¹, Nicolás Saffioti¹, Mariela Ferreira Gomes e Irene Mangialavori

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas. Dr. Prof. Alejandro Paladini. Universidad de Buenos Aires-CONICET

¹Ambos autores contribuyeron equitativamente en este trabajo

Marilina de Sautu y Nicolás Saffioti se incorporaron a nuestro grupo de investigación en el 2013 mientras cursaban el 9º cuatrimestre de la carrera de Bioquímica en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Iniciaron sus tareas de investigación bajo la dirección de las Dras. Mariela Ferreira Gomes e Irene Mangialavori, quienes eran becaria posdoctoral e investigador asistente del CONICET, respectivamente. Ambos estudiantes trabajaron en equipo en el estudio de la interacción de las bombas de calcio con el aluminio: Nicolás se dedicó a los estudios en la bomba de retículo sarcoplasmático y Marilina a los estudios en la bomba de calcio de membrana plasmática. Sus resultados fueron presentados en las reuniones anuales de la Sociedad de Biofísica Argentina, donde ambos estudiantes fueron primer autor y presentadores de sus trabajos.

Actualmente, Nicolás y Marilina están realizando su tesis doctoral en nuestro laboratorio bajo la dirección y co-dirección de las Dras. Irene Mangialavori y Mariela Ferreira Gomes. Si bien estos estudios no son parte de los planes de tesis, el esfuerzo, la dedicación y predisposición para la tarea en equipo de Marilina y Nicolás hicieron posible la presentación de este trabajo ante la honorable *Academia de Farmacia y Bioquímica*.

Introducción	49
Capítulo I	49
1.1. Las proteínas de membrana	49
1.2. Transporte de calcio a través de membranas	50
1.3. Las P-ATPasas	51
1.4. La bomba de calcio de membrana plasmática	51
1.4.a) Distribución tisular	51
1.4.b) El ciclo de reacción	52
1.4.c) La activación por calmodulina	52
1.4.d) La activación por fosfolípidos ácidos	53
1.4.e) Otros activadores	53
1.4.f) El lantano y el vanadato	53
1.5. Dominios estructurales y funcionales de la PMCA	54
1.6. La bomba de Ca^{2+} de retículo sarcoplasmático	54
1.7. Intermediarios del ciclo de reacción	55
1.7.a) $E_1\text{Ca}$	56
1.7.b) E_2	56
1.7.c) $E_1\text{P}$ y $E_2\text{P}$	57
Capítulo II	58
2.1. El Aluminio en solución acuosa	58
2.2 El Aluminio y otros metales	60
2.3 Exposición al Aluminio	60
2.3.a) El Aluminio en el medio ambiente	61
2.3.b) El Aluminio en el agua	61
2.3.c) El Aluminio en la dieta	61
2.4. Mecanismo de toxicidad del Aluminio	61
2.5. Aluminio y desórdenes de la memoria	62

2.6. Efectos del aluminio en el sistema nervioso central	62
2.7. Relación entre el aluminio y la enfermedad de Alzheimer	64
2.8. El aluminio induce apoptosis, disfunción mitocondrial y estrés en el retículo endoplásmico	64
2.9. El aluminio afecta la homeostasis de calcio	65
Capítulo III	65
3.1. Preparación de membranas.	65
3.2. Obtención de la PMCA purificada	66
3.3. Preparación de vesículas de retículo sarcoplasmático de musculo esquelético de conejo	66
3.4. Extracción de SERCA	67
3.5 Cuantificación de proteínas	67
3.6. Preparación de micelas mixtas fosfolípido-detergente	67
3.7 Determinación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa	67
3.7.a) Método colorimétrico	67
3.7.b) Método radiactivo	68
3.8 Determinación del intermediario fosforilado)	68
3.9. Estudio del flujo de calcio en cultivo de células HEK293T	69
3.9.a) Cultivo de células HEK293T	69
3.9.b) Mantenimiento del cultivo de células HEK293	69
3.9.c) Plaqueo de células HEK293T en placas de 96 pocillos	69
3.9.d) Determinación del flujo de calcio.	69
3.9.e) Carga del fluoróforo	69
3.10 Determinación del flujo de Ca^{2+} en células HEK293T mediado por PMCA	70
3.11. Ajustes de curvas y estimación de parámetros	71
3.12. Origen y calidad de las drogas utilizadas	71
Capítulo IV	71
4.1. Efecto del Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre la PMCA y la SERCA	71
4.2. Efecto del Aluminio sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa	72
4.3. Efecto del tiempo de preincubación de la enzima con aluminio	73
4.3.a) La primera fase (fase rápida) desaparece cuando el aluminio es preparado a pH 7.2	74
4.3.b) La inhibición de la SERCA y la PMCA por Al^{3+} solo ocurre en ausencia de ATP	77
4.3.c) En ausencia de ATP, el Al^{3+} se disocia lentamente de la SERCA y la PMCA	77
4.4. En presencia de ATP, el Al^{3+} se disocia de la SERCA pero no en la PMCA.	80
Capítulo V	81
5.1. El Al^{3+} se uniría al sitio de unión a Ca^{2+} en la SERCA pero no en la PMCA	81
5.2. La afinidad aparente por Mg^{2+} de la PMCA y la SERCA no se modifica por la presencia de Al^{3+}	83
5.3. El pH no afecta la inhibición por AlCl_3	84
5.4. La unión del Al^{3+} estabiliza el intermediario fosforilado (EP) en la PMCA pero no en la SERCA	86
5.5. La inhibición de la PMCA y la SERCA no involucra al complejo ATP-Al^{3+}	87
Capítulo VI	88
El modelo de la inhibición por Aluminio en las bombas de Calcio	88
6.1 Identidad del inhibidor involucrado	88
6.2 Efecto protector del ATP y el ciclo de reacción.	90

6.3 Mecanismo de la inhibición del Aluminio en SERCA.	91
6.4 Mecanismo de la inhibición del Al^{3+} en la PMCA.	91
6.5 Efecto del Mg^{2+} en el mecanismo de inhibición por Al^{3+} de la PMCA.	91
6.6 Comparación de las inhibiciones por Al^{3+} en SERCA y PMCA.	92
Capítulo VII	93
7.1. El aluminio inhibe a la PMCA en distintos entornos lipídicos	94
7.2. Efecto del Aluminio sobre el flujo de calcio y su vinculación con la PMCA: Estudios en cultivos de células intactas.	95
Conclusiones Generales	99
Referencias	100

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

1.1. LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA

De acuerdo al modelo postulado por Popot y col. (1989), el plegamiento de las proteínas de membrana incluye dos estados energéticos. En el primero, se plegarían los elementos de estructura secundaria de manera independiente dentro de la membrana. En un segundo estado, estos elementos ya formados interactuarían entre sí para dar lugar a la estructura final de la proteína de membrana. Existiría una primera instancia en donde cada hélice se encontraría plegada dentro de la membrana como una entidad estable e independiente.

Las hélices transmembrana son consideradas como dominios autónomos de plegamiento y la estructura transmembrana final como el resultado del ensamblaje de elementos pequeños cada uno de los cuales ha alcanzado el equilibrio termodinámico. Se espera que ocurran ciertos ajustes en este ensamblaje final pero la inserción de nuevos segmentos o el cambio de sentido de las hélices transmembrana se consideran prohibidos desde el punto de vista cinético. El despliegue de una hélice dentro de la membrana está altamente desfavorecido porque implicaría la ruptura de los puentes de hidrógeno en un entorno no polar. Su transferencia desde la membrana al medio acuoso está desfavorecida ya que implicaría una reducción importante de la entropía del agua que debería ordenarse alrededor de los aminoácidos hidrofóbicos. Una hélice transmembrana resulta entonces en una estructura tan estable que permite la inclusión de aminoácidos con grupos polares en un entorno lipídico sin alterar su estabilidad. La segunda fase del plegamiento consiste en el ensamblaje de hélices que son estables de manera independiente. Las asociaciones que se establecen entre las hélices conducen a un estado más ordenado, lo que implica que estas interacciones deben ser lo suficientemente favorables desde el punto de vista energético como para vencer el término entrópico (del orden de 1-10 kcal/mol para un par de hélices) que favorece la separación entre hélices transmembrana. Estas interacciones incluyen la formación de puentes de hidrógeno, pares iónicos e interacción entre los dipolos de las hélices. Además, el empaquetamiento favorece la asociación entre hélices ya que reduce la superficie de contacto con los lípidos. Por último la interacción con grupos prostéticos u otras moléculas así como las uniones fuera de la membrana entre las hélices actuarían fijando una estructura ordenada y favoreciendo la asociación.

La asociación de hélices puede crear por sí misma un entorno localizado propicio para una última instancia en el plegamiento (Engelman y col., 2003). Este entorno se caracteriza por ser menos hidrofóbico que el entorno lipídico alrededor del paquete de hélices. La necesaria inclusión de aminoácidos con cadenas laterales polares (la reactividad química de las cadenas puramente alifáticas es muy limitada) determina que existan grupos aceptores de puentes de hidrógeno dentro de la membrana. Partes de la cadena polipeptídica pueden ser incluidas en el paquete preformado de hélices gracias a que satisfacen la formación de puentes de hidrógeno con estos grupos. La interacción entre hélices puede además crear espacios dentro de la membrana que alojan partes de la cadena polipeptídica con un plegamiento menos regular. Por último, sólo mediante la interacción entre hélices se crean cavidades cóncavas que representen superficies sobre las que un grupo prostético puede unirse. Las consecuencias de la asociación entre hélices aportan un marco en el que se pueden extender los conceptos de plegamiento de proteínas de membrana.

1.2. TRANSPORTE DE CALCIO A TRAVÉS DE MEMBRANAS

La membrana es poco permeable a los cationes, especialmente a los divalentes. Los mecanismos que generan un aumento de Ca^{2+} en el citoplasma dependen de canales que permiten el pasaje del ion desde el compartimiento extracelular o desde reservorios intracelulares. Dada la diferencia de concentraciones a ambos lados de la membrana, la entrada del ion al citoplasma a través de estos canales ocurre siempre a favor de su gradiente de potencial electroquímico. El ingreso de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares hacia el citoplasma está mediado principalmente por canales activados por segundos mensajeros. El reservorio de Ca^{2+} intracelular más importante es el retículo endoplásmico. En la membrana de esta organela se encuentran receptores de inositol 1,4,5 trifosfato y receptores de rianodina. Los receptores de inositol 1,4,5 trifosfato están presentes en la mayoría de las células de mamífero. Como respuesta a la unión de su ligando cambian su conformación, produciendo la apertura de un canal integral de la membrana a través del cual el Ca^{2+} sale hacia el citoplasma siguiendo su gradiente de potencial electroquímico. La activación de estos receptores está modulada por la concentración citoplasmática de Ca^{2+} . Los receptores de rianodina son estructural y funcionalmente análogos a los de inositol 1,4,5 trifosfato, y comparten inclusive su modulación por Ca^{2+} . Se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico de células excitables (Bootman y col., 2001).

La sobrecarga de Ca^{2+} en el citoplasma de cualquier célula conduce a la activación de enzimas hidrolíticas dependientes de Ca^{2+} e inevitablemente a la muerte celular. La homeostasis del ion depende de múltiples mecanismos que, a expensas de la energía proveniente de la hidrólisis de ATP o de la energía proveniente de la disipación del gradiente de concentración de un contra-ión, mantienen las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} en el rango nanomolar.

El intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ es el sistema más importante de transporte en tejidos excitables como el músculo cardíaco (Pott y col., 2004). Está presente en la membrana plasmática y acopla el flujo de entrada de Na^+ con el flujo de salida de Ca^{2+} . El transporte de Na^+ ocurre a favor de su gradiente de potencial electroquímico de manera que provee la energía necesaria para transportar el Ca^{2+} . Como el transporte es electrogénico (se intercambian 3 iones Na^+ por un ion Ca^{2+}), la actividad del intercambiador depende del potencial de membrana. Este mecanismo de transporte de Ca^{2+} está ausente en membranas de eritrocitos (Carafoli, 1987).

La bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática transporta Ca^{2+} hacia el medio extracelular a expensas de la energía provista por la hidrólisis de ATP. Esta proteína constituye un sistema de transporte con alta afinidad para el Ca^{2+} . A diferencia del intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ que requiere de concentraciones micromolares de Ca^{2+} para transportarlo eficientemente, la bomba de Ca^{2+} es activa aún cuando el ion se encuentra en concentraciones submicromolares (Guerini y col., 2005) de manera que es capaz de mantener su concentración citoplasmática en el orden de 0.1 μM . Las propiedades funcionales y estructurales de esta proteína se analizan en detalle en la sección 3.

La bomba de Ca^{2+} de retículo endoplásmico es la enzima responsable de la acumulación de Ca^{2+} dentro de esta organela. Su actividad permanece constante frente a un amplio rango de concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} . Por el contrario, altas concentraciones del ion dentro del retículo endoplásmico inhiben el transporte, de manera que la concentración intraluminal de Ca^{2+} se mantiene dentro del rango de 100-800 μM (Burdakov y col., 2005).

Existe un mecanismo de baja afinidad mediante el cual el Ca^{2+} ingresa a la mitocondria. Este transporte está regulado por la concentración de Ca^{2+} citoplasmática y requiere que ésta se encuentre por encima de 0.5 μM . El secuestro mitocondrial de Ca^{2+} es importante en células excitables como mecanismo para regular la concentración citoplasmática del ion. En la matriz mitocondrial se forman complejos de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lo que permite la acumulación neta de Ca^{2+} en esta organela manteniendo la concentración de Ca^{2+} libre en el rango de 0.5-2 μM (Nicholls, 2005).

1.3. LAS P-ATPASAS

Las P-ATPasas son una familia de proteínas involucradas en el transporte activo de sustratos cargados a través de membranas biológicas utilizando la energía de la hidrólisis de ATP (Moller y col., 1996). La característica que las agrupa es la formación de un intermediario de reacción fosforilado estable en medio ácido a partir de la transferencia del último fosfato del ATP a un residuo de ácido aspártico ubicado en el sitio catalítico de la enzima. Las P-ATPasas son agrupadas en al menos cinco grupos principales y varios subgrupos. La Bomba de Calcio de Retículo Sarcoplásmico (SERCA) y la Na,K-ATPasa pertenecen P-ATPasas al grupo II.

Desde el punto de vista estructural presentan una unidad catalítica en la que se predicen 10 segmentos transmembrana y cuatro segmentos intracelulares de diferente longitud. Una gran fracción de la masa de la proteína está constituida por el segmento intracelular que conecta los transmembrana 4 y 5 (M4 y M5) donde se identifican dos dominios citoplasmáticos, el dominio de fosforilación (P) y el dominio de unión al ATP (N).

En el segmento que conecta M2 con M3 se encuentra el dominio de activación (A), que constituye el menor de los tres dominios.

La bomba de Calcio de Membrana Plasmática (PMCA) también es una P-ATPasa tipo II sin embargo, a diferencia de la SERCA y la Na,K-ATPasa, presenta un segmento citoplasmático C-terminal, que constituye una importante diferencia entre estas bombas.

El dominio P presenta una alta homología de secuencia en estas tres P-ATPasas. En el dominio transmembrana, teniendo en cuenta la probabilidad de sustitución de aminoácidos según el código genético el bloque M1 a M6, permite un alineamiento del 80% (Sweadner y col., 2001).

1.4. LA BOMBA DE CALCIO DE MEMBRANA PLASMÁTICA

1.4.a) Distribución tisular

La bomba de calcio se localiza en la membrana plasmática de todas las células eucariotas. Hay 4 genes que codifican para distintas isoformas de la proteína. La isoforma 2 se expresa principalmente en células del sistema nervioso central. La isoforma 3 se expresa en células excitables y páncreas (García y col., 2002). Las isoformas 1 y 4 se expresan de manera ubicua (Guerini y col., 2005). A partir del procesamiento alternativo del RNA de cada gen transcrito se generan 30 variantes de la proteína que se designan con letras (*a* a *h*) después del número que indica a cuál gen corresponde esa isoforma. Según la nomenclatura propuesta la letra antes del número designa las isoformas de rata “r” o de humano “h”. La isoforma hPMCA4b constituye el 80% del total de bomba de calcio en eritrocitos humanos; el 20% restante corresponde a la isoforma hPMCA1b (Strehler y col., 1990). En ningún caso la abundancia de la enzima excede el 0.1% del total de las proteínas de membrana.

1.4.b) El ciclo de reacción

El modelo cinético propuesto para el mecanismo de hidrólisis de ATP por la bomba de calcio (Rega y Garrahan, 1986) se representa esquemáticamente en la Fig. 1.4.2. En cada ciclo de reacción, por cada mol de ATP hidrolizado se intercambian electrogénicamente, un mol de Ca^{2+} por un mol de H^+ (Rossi y Schatzmann, 1982; Hao y col., 1994).

En ausencia de ATP, el equilibrio conformacional de la enzima se encuentra desplazado hacia la conformación E_2 . En presencia de Ca^{2+} , este equilibrio se desplaza hacia la forma E_1 (Adamo y col., 1990). La unión del ATP al intermediario $\text{E}_1\text{-Ca}^{2+}$ es seguida por la fosforilación de la enzima generándose $\text{E}_1\text{P- Ca}^{2+}$. La enzima cambia de conformación a $\text{E}_2\text{P- Ca}^{2+}$, reacción que al igual que la anterior es acelerada por Mg^{2+} (Garrahan y Rega, 1978). El sitio de unión al Ca^{2+} en este último intermediario ($\text{E}_2\text{P- Ca}^{2+}$) se encuentra expuesto hacia el medio externo y presenta baja afinidad por el ion de manera que éste es liberado. E_2P se desfosforila regenerando E_2 .

La unión de ATP a un sitio de baja afinidad en el intermediario E_2P genera $\text{E}_2\text{P-ATP}$ que es rápidamente desfosforilado a E_2ATP liberándose fosfato al medio intracelular. E_2ATP puede liberar ATP o sufrir un cambio conformacional a E_1ATP completando así la vía alternativa del ciclo de reacción.

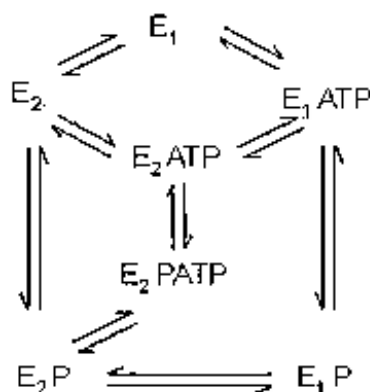


Figura 1.1 Ciclo de reacción para la hidrólisis de ATP catalizada por la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática. E_1 y E_2 son las dos conformaciones extremas clasificadas por su afinidad al calcio.

1.4.c) La activación por calmodulina

El modulador más importante de la actividad de la bomba de calcio es la calmodulina (CaM), una proteína de 16500 kDa, con alto contenido de aminoácidos ácidos y que se encuentra en el orden de 2-3 μM en el citoplasma (Cheung, 1980). La calmodulina interactúa con el extremo C-terminal de la bomba de calcio y se postula que su mecanismo de acción consiste producir un cambio conformacional en la PMCA que interrumpe la asociación de este dominio con una región cercana al sitio catalítico de la enzima (Fig. 1.2).

El complejo $\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$ se une a la PMCA frente a un aumento en la concentración de Ca^{2+} , provocando el cambio desde una conformación autoinhibida hacia una conformación activada (Sarkadi y col., 1987; Corradi y col., 2007).

En presencia de calmodulina la constante de afinidad aparente de la bomba por el Ca^{2+} -determinada mediante actividad $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ - disminuye de 20 μM a 0.5 μM (Niggli y col., 1981).

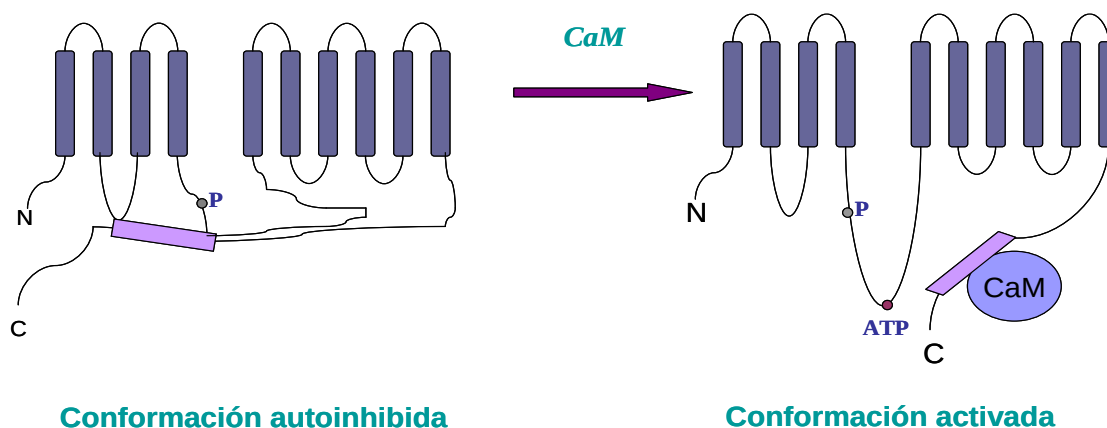


Figura 1.2.: Esquema de la activación de la PMCA por calmodulina. Se muestran la conformación autoinhibida (*Izq.*) y la activada (*Der.*). El rectángulo lila representa el sitio de unión de CaM en el dominio C-terminal de la bomba (Modificado de Mangialavori y

1.4.d) La activación por fosfolípidos ácidos

Los fosfolípidos ácidos, como el ácido fosfatídico, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, aumentan la afinidad aparente de la enzima por el calcio (Niggli y col., 1981; Enyedi y col., 1987). Pero, a diferencia del mecanismo de acción de la calmodulina, estos compuestos aceleran la desfosforilación de la enzima (Filomatori y col., 2003).

Se ha propuesto que estos fosfolípidos interactúan con el dominio de unión a calmodulina (Filoteo y col., 1992). Sin embargo, el aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} provocado por éstos (Enyedi y col., 1987) llevó a sugerir la existencia de un sitio independiente ubicado en el extremo C-terminal del segmento que une los transmembrana 2 y 3 de la PMCA (de Tezanos Pinto y col., 2001).

1.4.e) Otros activadores

Si bien los activadores más importantes de la PMCA son la calmodulina los fosfolípidos ácidos, cabe mencionar que las proteínas-quinasa dependientes de AMP cíclico y la proteína quinasa C fosforilan la bomba de calcio y aumentan su actividad (Caroni y col., 1981; Wang y col., 1991).

1.4.f) El lantano y el vanadato

No han sido descriptos inhibidores específicos para la PMCA. El lantano (La^{III}) y el vanadato ($(\text{VO}_4)^{3-}$) son inhibidores de las P-ATPasas, por lo que también inhiben a la PMCA. El transporte de calcio es inhibido por la presencia de $[\text{VO}_4]^{3-}$ y de La^{III} . El mecanismo de inhibición del primero por analogía al propuesto para la Na,K-ATPasa (Karlsh y col., 1979) consistiría en bloquear la transición a E_2 a E_1 . El vanadato se une al sitio de fosforilación de las P-ATPasas, impidiendo la fosforilación a partir de ATP, y “fijando” a la enzima en una conformación análoga a E_2P (Rossi y col., 1981). Muestra una interacción de afinidad negativa con respecto a la concentración de ATP (Barrabin y col., 1980). La inhibición por $[\text{VO}_4]^{3-}$ es antagonizada por Ca^{2+} , concentraciones saturantes de este catión –mayores a 50 μM - causan la restitución progresiva de la actividad Ca^{2+} -ATPasa (Rossi y col., 1981; Lytton y col., 1992).

Por otra parte, el La^{III} impide la transición entre E_1P y E_2P , desplazando el equilibrio conformacional hacia el primer intermediario (Guerini y col., 1999). Si bien, al igual que el $[\text{VO}_4]^{3-}$, causa la inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa, su mecanismo de acción es claramente diferente: el vanadato impide la fosforilación de la PMCA y el lantano estabiliza el intermediario fosforilado impidiendo la defosforilación. En la PMCA se comportaría como un inhibidor competitivo del Mg^{2+} (Herscher y col., 1996) mientras que en la SERCA compite con Ca^{2+} y consecuentemente, impide la fosforilación de la bomba (Corre y col., 2003).

1.5. DOMINIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA PMCA

Como ya mencionamos, la isoforma de mayor abundancia en eritrocitos humanos es la hPMCA4b. Esta proteína está constituida por una única cadena polipeptídica de 1205 aminoácidos cuya masa molecular relativa es aproximadamente 134000.

Desde el punto de vista estructural, la PMCA presenta características comunes con el resto de las P-ATPasas. El dominio transmembrana está constituido por 10 segmentos putativos (M1-M10). En la región citoplasmática presenta tres zonas claramente definidas: el segmento que une M2 y M3, el que une M4 y M5, de mayor longitud que el anterior y un tercer segmento ubicado río abajo de M10. Los extremos N y C de la enzima, se encuentran ambos en la zona citoplasmática.

Dentro de la estructura primaria de la bomba de calcio se han identificado aminoácidos que forman parte de dominios funcionales importantes. El residuo de lisina en la posición 591 como el aminoácido al que se une el isotiocianato de fluoresceína o eosina y que se admite como parte del sitio de unión del ATP (Filoteo y col., 1987), el residuo de ácido aspártico en la posición 465 como el aminoácido que se fosforila durante el ciclo de reacción (James y col., 1987) y los aminoácidos comprendidos entre el residuo de leucina en la posición 1086 y el de lisina en la posición 1105 como los aminoácidos que forman el dominio de unión a calmodulina (James y col., 1988).

Las regiones comprendidas entre los aminoácidos 537-544 y 206-271, interactúan con el dominio C-terminal en ausencia de calmodulina (Falchetto y col., 1992).

Si bien, las regiones entre los aminoácidos 348-370 y 1100-1119 han sido postuladas como los sitios involucrados en la activación por ácido fosfatídico (Brodin y col., 1991). La delección de la primera es esencial para la modulación por fosfolípidos ácidos (de Tezanos Pinto y col., 2002).

La región transmembrana se encuentra organizada en tres grandes dominios transmembrana (Castello y col., 1994), de los cuales el correspondiente al extremo N-terminal de la proteína, está integrado por dos α -hélices transmembrana formando un motivo estructural en horquilla (Castello y col., 1997).

Por analogía con el sitio II de unión a Ca^{2+} en la SERCA, algunos aminoácidos constituyentes de M4 estarían involucrados en la unión de Ca^{2+} (Adebayo y col., 1995; Rinaldi y col., 2010).

1.6. LA BOMBA DE Ca^{2+} DE RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO

La primera estructura de una P-ATPasa fue resuelta con alta definición por Toyoshima y col. (2000). El esquema obtenido a partir de las coordenadas atómicas se muestra en la Fig. 1.3.

La región transmembrana de esta proteína está compuesta por 10 segmentos transmembrana (M1-M10) cuyo límite fue definido por un anillo de residuos de triptofano del lado citosólico y por la distribución de moléculas de H_2O de hidratación. Existe una clara separación entre los 6 segmentos correspondientes al extremo N-terminal (M1-M6) y los 4 correspondientes al extremo C-terminal (M7-M10), consistente con el hecho de que estos últimos se encuentran ausentes en P-ATPasas de tipo I en bacterias. La SERCA posee dos sitios de unión a Ca^{2+} , en la formación del sitio I participan aminoácidos de M5, M6 y M8. El sitio II estaría vinculado sólo con M4.

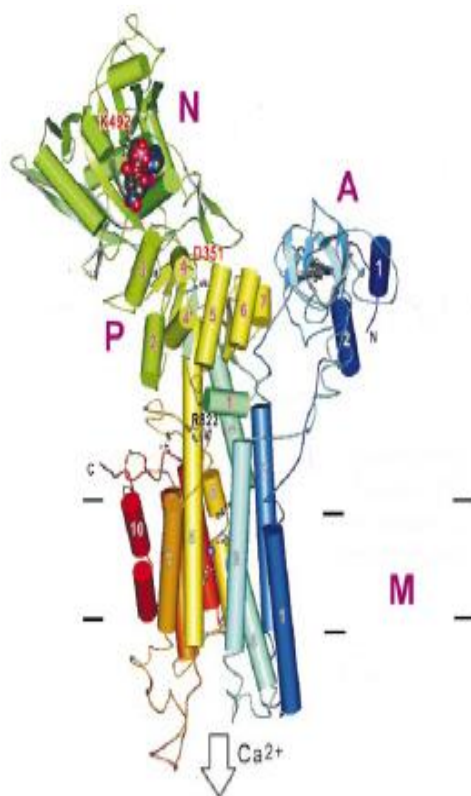


Figura 1.3. Estructura de la bomba de Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico. Las α -hélices se representan como cilindros y las hojas β como flechas. El cristal fue obtenido en presencia del análogo no hidrolizable de ATP; TMP-AMP que se muestra en la figura ubicado en el dominio N. Se muestran además los dos iones Ca^{2+} unidos al dominio transmembrana. (Tomado de Toyoshima y col., 2000)

No se observan en la estructura grandes espacios que puedan ser asignados a un canal por el que el Ca^{2+} llegue hasta sus sitios de unión. La ruta de acceso del Ca^{2+} se postula ubicando una cavidad accesible al H_2O del lado citoplasmático que se continúa hacia el centro de la membrana con una fila de aminoácidos que constituyen una vía hidrofílica para el ión. La región citoplasmática de esta proteína está compuesta por 3 grandes dominios: el dominio de menor tamaño es el de transducción o accionamiento (A) conectado a M2 y M3, el dominio de fosforilación (P) conectado a M4 y M5, y el dominio de unión al ATP (N) conectado al dominio P (Toyoshima y col., 2000).

1.7. INTERMEDIARIOS DEL CICLO DE REACCIÓN

La obtención de cristales de la bomba de calcio de retículo sarcoplásmico en conformaciones que corresponden a distintos intermediarios del ciclo de reacción permite enfocar el análisis del mecanismo del transporte de Ca^{2+} desde un punto de vista estructural.

La Fig. 1.4 esquematiza el ciclo de reacción propuesto por de Meis y Vianna (1979). El ciclo se basa en el modelo $\text{E}_1\text{-E}_2$ aceptado como el más adecuado para describir el funcionamiento de las P-ATPasas. Durante este ciclo se transportan dos Ca^{2+} hacia el lumen de retículo sarcoplásmico, por cada molécula de ATP hidrolizada .

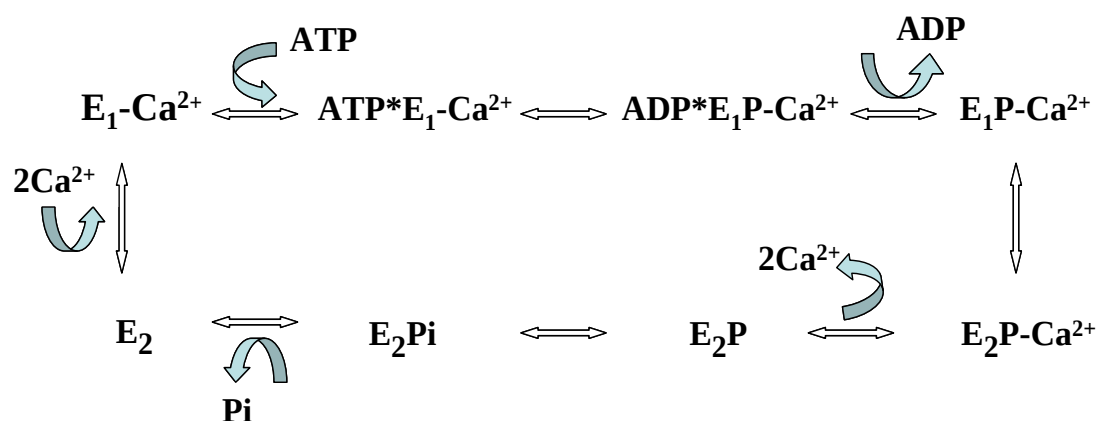


Figura 1.4: Ciclo de reacción propuesto para la SERCA, basado sobre el modelo E_1E_2 . Modificado de de Meis y Vianna (1979)

En ausencia de Ca^{2+} , la enzima se encontraría en equilibrio entre las conformaciones E_1 y E_2 . La primera tiene alta afinidad por Ca^{2+} y su sitio de unión se encuentra accesible al citoplasma.

La conformación E_2 , tiene baja afinidad por el catión y el sitio de unión al Ca^{2+} se encontraría expuesto al lado opuesto de la membrana. Si bien este es el modelo propuesto, ha sido cuestionado por algunos grupos de investigación (Champeil y col., 1983; Dupont y col., 1982; Coan y col., 1986; Scarborough y col., 2003).

1.7.a) E_1Ca

La presencia de Ca^{2+} , desplaza el equilibrio conformacional hacia E_1 , cuya alta afinidad por el catión permite su unión alcanzando $E_1-2 Ca^{2+}$. La unión del Ca^{2+} provoca la reorganización de los segmentos transmembrana de enzima, -fundamentalmente M1-M6- que toman una distribución mucho más compacta. Esta nueva disposición permitiría una eficiente geometría de coordinación y proveería una red de átomos de oxígeno para guiar al Ca^{2+} hacia su sitio y desplazar las moléculas de agua al mismo tiempo (Toyoshima y col., 2000). Este cambio es rápidamente transmitido a los dominios citoplasmáticos, que cambian su posición respecto a segmentos M4 y M5. El mayor movimiento lo sufre el dominio P, que rota 90° , causando un cambio en la orientación de M1-M3, que repercute en el dominio A. El dominio N, por su parte, rota 20° respecto del dominio P. El resultado final es una conformación en la que los tres dominios citoplasmáticos se encuentran alejados en el espacio (Fig. 1.4). La gran reestructuración provocada por la unión de Ca^{2+} es consistente con la idea de que puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura 3D sean desestabilizados a expensas de que se formen nuevos entre otras parte de la molécula (Toyoshima y col., 2000).

1.7.b) E_2

La estructura cristalográfica en ausencia de Ca^{2+} se muestra en la Fig. 1.5 y ha sido obtenida en presencia de tapsigargina y EGTA (Toyoshima y col., 2002; Takahashi y col., 2007). La tapsigargina es un promotor tumoral, un sesquiterpeno lactona obtenido de la planta *Tapiza garganica* (Jackson y col., 1988; Scharff y col., 1988), que inhibe la actividad de la SERCA impidiendo el equilibrio $E_2 - E_1$, fijando la proteína de toda la proteína provoca la liberación del Ca^{2+} del lado opuesto de la membrana del retículo endoplásmico.

Esto modifica en el dominio transmembrana 6 de las 10 hélices (M1-M6), es decir este cambio no queda limitado a las hélices que forman parte de los sitios de unión del Ca^{2+} (M4-M6 y M8). M1, por ejemplo, se desplaza quedando inmerso en la membrana, casi totalmente paralelo a ésta. El dominio N se inclina $\approx 90^\circ$ con respecto a la membrana y el dominio A rota en la conformación E_2 (Sagara y col., 1991). Un pronunciado movimiento 110° de manera horizontal, como resultado el dominio N se mueve $50 \text{ \AA}$ (Toyoshima y col., 2002). En esta conformación, los tres dominios citoplasmáticos se encuentran más cercanos en el espacio (Fig. 2.3.1).

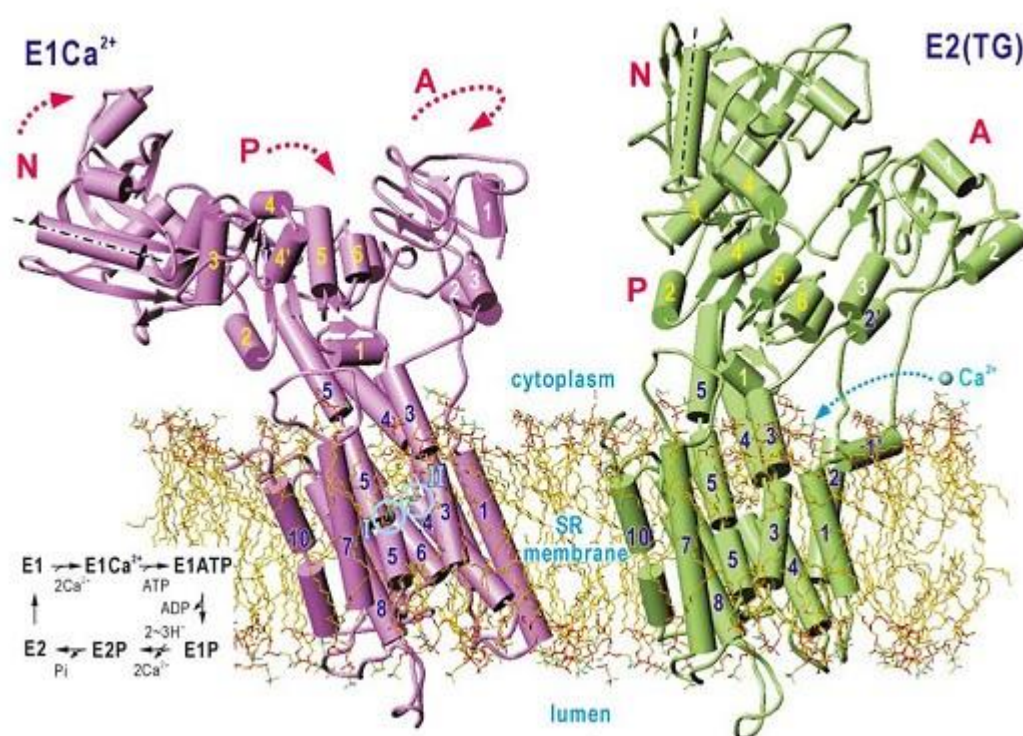


Figura 1.5: Representación esquemática de las conformaciones E_1Ca^{2+} y E_2TG . Las flechas rojas muestran la dirección del movimiento de los dominios citoplasmáticos, necesarios para alcanzar la nueva conformación. Los círculos celestes representan las dos moléculas de Ca^{2+} unidas al dominio transmembrana en E_1Ca^{2+} . Tomado de

1.7.c) E_1P y E_2P

En el intermediario de alta energía $E_1Ca^{2+}P$, el calcio se encuentra ocluido –inaccesible a las soluciones que bañan ambas caras de la membrana-. La estructura de este intermediario fue obtenida en presencia del análogo no hidrolizable de ATP, 5'-(β,γ -metilen)trifosfato (AMPPCP) (Toyoshima y col., 2004; Sorensen y col., 2004). El Ca^{2+} puede ser liberado en el lumen del retículo mediante un mecanismo de “apertura”, que involucra la separación de M1-M2, M3-M4 y M5-M6, pasando a la conformación E_2P . Esta transición resulta en una disminución de la afinidad por Ca^{2+} .

La energía proviene de la hidrólisis de ATP y el dominio A, que involucra a M1 y M2, controla la apertura y cierre hacia el lumen, mientras que el dominio P actúa como fuerza impulsora para el movimiento de M5-M6 (Toyoshima y col., 2004). Las mayores diferencias provocadas por la unión de ATP y la subsiguiente fosforilación de la enzima estarían ubicadas en la región citoplasmática – a excepción de M1 que sufre un cambio en su disposición respecto a la membrana-, a diferencia de la unión de Ca^{2+} , que involucra un gran cambio en toda la proteína (Fig. 1.6).

E_2P , obtenido en presencia de trifluoruro de berilio (BeF_3^-), expone hacia el lumen del retículo el sitio de unión para H^+ (Olesen y col., 2007), la rotación del dominio A y el movimiento del dominio P favorecerían su oclusión (Fig. 1.6). La desfosforilación (E_2) y la unión de una nueva molécula de ATP (E_2ATP), permiten que el ciclo se complete (Olesen y col., 2007).

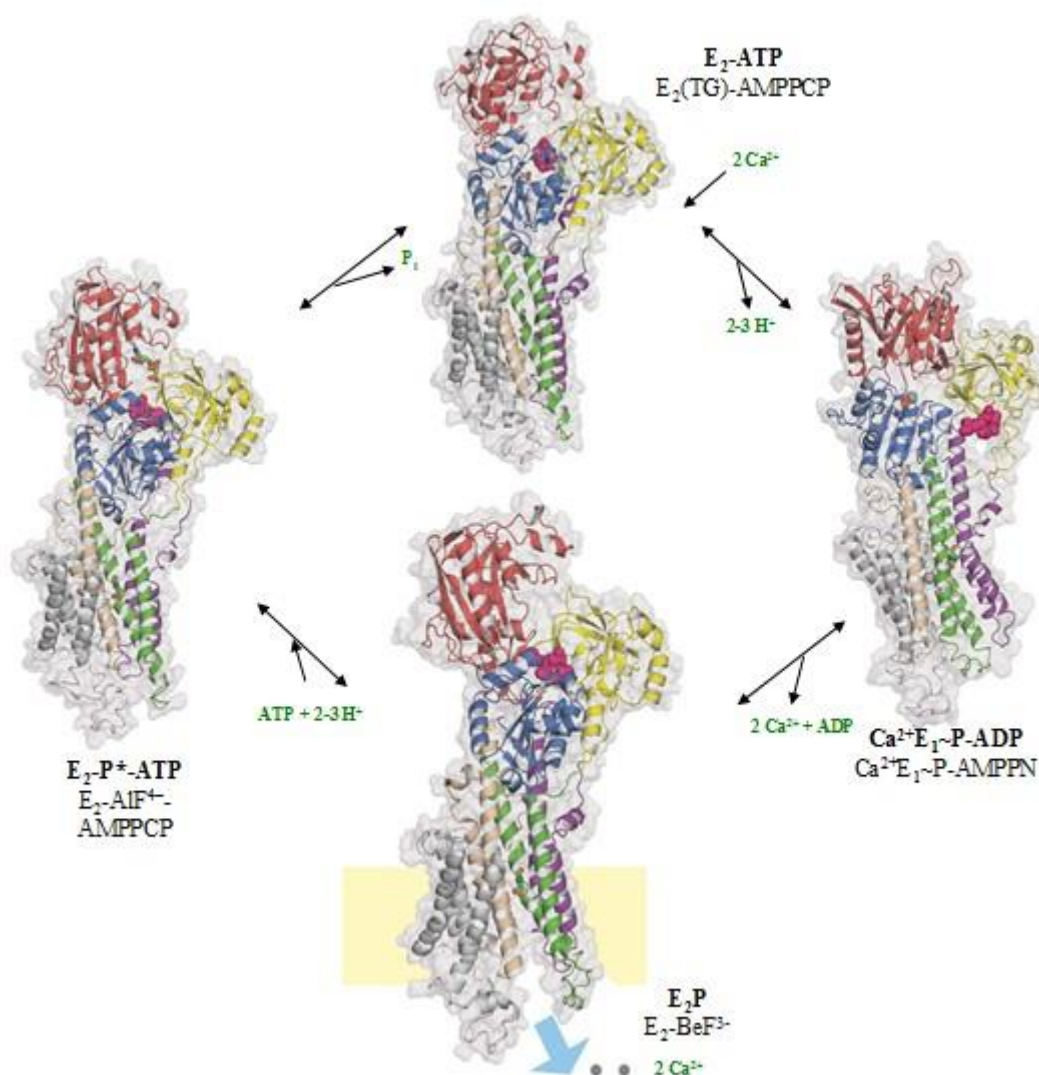


Figura 1.6. Comparación de las estructuras del ciclo de reacción de SERCA: $\text{Ca}^{2+}\text{E}_1\text{P-AMPPN}$, $\text{E}_2\text{-BeF}_3^-$, $\text{E}_2\text{-AlF}_4^-$ y $\text{E}_2\text{-TG-AMPPCP}$. El dominio A se muestra en amarillo, el dominio N en rojo y el dominio P en azul. Los segmentos transmembrana M1-M2 en violeta, M3-M4 en verde, M-M6 en crema y M7-M10 en gris. Modificado a partir de Olesen y col., 2007).

CAPÍTULO II

2.1. EL ALUMINIO EN SOLUCIÓN ACUOSA

El Aluminio libre (Al^{3+}) en solución acuosa se encuentra coordinado por 6 moléculas de agua en una configuración octaédrica como muestra la Fig. 2.1 y se representa por la fórmula $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ (Garrison Sposito, 1995). Esta fórmula fue estimada por diferentes autores mediante consideraciones empíricas y teóricas, y luego fue confirmada por espectros de RMN.

Debido a la elevada carga positiva del Al^{3+} estas moléculas de agua forman una fuerte unión primaria, dando lugar a una capa de hidratación al Aluminio

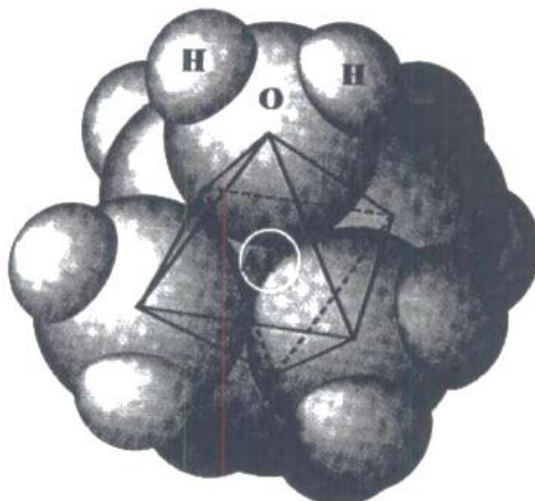
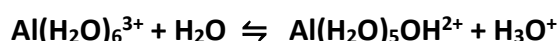
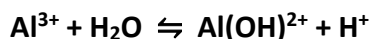


Figura 2.1: Estructura del ion Aluminio libre en solución acuosa. Tomado de Garrison Sposito, 1995.

En solución se produce una hidrólisis progresiva de las moléculas de agua para mantener el equilibrio de disociación. La primera disociación es:



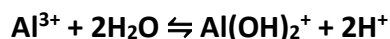
Que a partir de ahora serán escritas como:



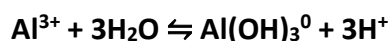
El p^*K_1 de la primera reacción de hidrólisis tiene un valor de 5.00.

Las constantes de hidrólisis del Al^{3+} fueron medidas usando diferentes técnicas como potenciometría, espectroscopia, espectrofotometría, calorimetría y electroquímica. Holmes y col. determinaron constantes de velocidad específicas de 4.4×10^9 y $1.1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ para la asociación de protones y las reacciones de disociación, respectivamente, para la primera reacción de hidrólisis de $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. Los cambios en la concentración de protones en la solución resultan en una redistribución simultánea de las especies de Aluminio (Holmes y col., 1968).

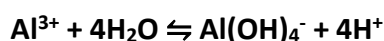
La segunda reacción de hidrólisis tiene un valor de $p^*\beta_2$ de 10.1 y se representa como:



La tercera reacción de hidrólisis tiene un valor de $p^*\beta_3$ de 16.8 aproximadamente y consiste en:



Mientras que la última, posee un $p^*\beta_4$ de 22.9 y se representa:



Muchos autores han publicado diferentes constantes obtenidas por técnicas diversas. Los valores que mostramos anteriormente corresponden a promedios publicados por Garrison Sposito en su libro *The environmental chemistry of Aluminum* (1995).

El ion aluminato ($\text{Al}(\text{OH})_4^-$) es el producto de la última reacción de hidrólisis y es un complejo donde el Al^{3+} está tetraédricamente coordinado por aniones hidróxido. Es la especie de mayor concentración en soluciones acuosas a pH 7,00 (25°C).

2.2 EL ALUMINIO Y OTROS METALES

El Aluminio tiene una fuerte carga positiva y un radio iónico relativamente pequeño (50 pm) en comparación con otros iones como Ca^{2+} (99 pm), Zn^{2+} (74 pm), Na^+ (95 pm). Estas características le permiten al Al^{3+} unirse firmemente a aminoácidos que unen metales como son histidina, tirosina o arginina, entre otros. A su vez, puede unirse a aminoácidos fosforilados y actuar como *cross-linker* entre varias proteínas.

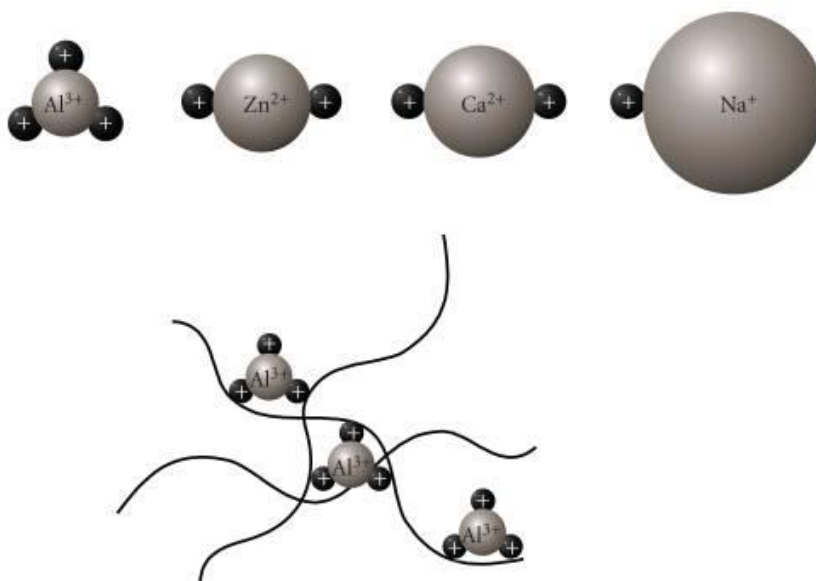


Figura 2.2. Esquema del *cross-linking* de proteínas por Al^{3+} . El Al^{3+} tiene un radio iónico pequeño (50 pm) con 3 cargas positivas; aquí es comparado con otros iones metálicos como el Zn^{2+} (74 pm), Ca^{2+} (99 pm) y Na^+ (95 pm). Tomado de Tawahara y col., 2011.

2.3 EXPOSICIÓN AL ALUMINIO

El Aluminio es un elemento no esencial, ampliamente en el medio ambiente. Ha sido asociado con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson y encefalopatía de diálisis. El primer aislamiento de Aluminio fue en 1827, por lo que se trata de metal relativamente nuevo. Gracias a sus características beneficiosas de ser no magnético, liviano, maleable, entre otras, tiene una utilización importante en industria y en productos de consumo. También se lo utiliza en utensilios de cocina y en agentes farmacológicos que incluyen antiácidos, antitranspirantes y coadyuvantes en vacunas (Kawahara y col., 2011).

2.3.a) El Aluminio en el medio ambiente

El aluminio es un metal químicamente muy reactivo, por lo que en la naturaleza no se encuentra libre sino que se encuentra en combinado con hidróxido, silicato, sulfato y fosfato. La amplia distribución del aluminio en el medio ambiente, aumenta la probabilidad de exposición de los humanos este elemento. La forma de exposición más importante del ser humano al aluminio proviene de la alimentación.

El consumo humano promedio de aluminio, sólo proveniente de alimentos y bebidas, es de 2,5 a 13 mg/día, y puede ser aún mayor si se trata de alimentos procesados. Este consumo varía con la composición de la comida, país de residencia, edad y sexo, pero sólo es absorbido el 1% del aluminio consumido (Frisardi V y col., 2010 y Greger JL y col., 1993).

2.3.b) El Aluminio en el agua

La biodisponibilidad del aluminio en agua es mayor que la del elemento en los alimentos (0,3% y 0,1 %, respectivamente), pero debido a las diferencias a la ingesta diaria, se considera mayor la exposición humana proveniente de alimentos (Forbes y col., 1995; Vogt, 1986).

La organización mundial de la salud (OMS) recomienda que las concentraciones del aluminio en agua no excedan 0,2 mg/l, debido a la relación entre éste y la enfermedad de Alzheimer (World Health Organization, 1997).

Un estudio de investigación transversal en Inglaterra y Gales (Martyn y col., 1989), encontró el riesgo de enfermedad de Alzheimer era 1,5 veces mayor en distritos donde la concentración de aluminio en agua excedía 0,11 mg/L. En Francia, Roundeau y col. (2000) utilizaron la información de un gran estudio de cohorte prospectivo que evaluó durante 8 años, 3777 sujetos de 65 años de edad en adelante, y se registraron todos los nuevos casos de demencia y Enfermedad de Alzheimer. En las áreas residenciales estudiadas el rango de exposición al Aluminio fue de 0,001-0,459 mg/L en el agua. Los datos fueron analizados ajustando por edad, género, nivel educacional, lugar de residencia, y el estudio reveló que el riesgo de demencia fue mayor en individuos que vivían en áreas con elevados niveles de Aluminio en agua. (>0,1 mg/L) comparado con las personas que vivían en áreas con concentraciones menores de 0,1 mg/L en agua.

2.3.c) El Aluminio en la dieta

El aluminio presente en los alimentos puede provenir de fuentes naturales, del agua utilizada para su preparación o de aditivos. Dependiendo de diferentes variables la concentración del aluminio en los alimentos puede variar, sobre todo en los vegetales que puede adherirse a través del suelo. Un estudio conducido por Rogers and Simon (1999) determinaron que ciertos alimentos tienen mayores concentraciones de aluminio donde se encuentran el queso americano, chocolate, rosquillas, muffins, waffles, galletitas, pan de maíz. Algunos alimentos se los clasifica como acumuladores de aluminio ya que contienen más de 5 mg del elemento por gramo de alimento, por ejemplo, las hierbas y el té. Los aditivos tienen un alto contenido de este metal, por lo que en Estados Unidos el consumo dietario de aluminio es mayor debido al alto consumo de alimentos con aditivos.

2.4. MECANISMO DE TOXICIDAD DEL ALUMINIO

El mecanismo exacto por el cual el aluminio atraviesa la barrera hematoencefálica es desconocido. Debido a que posee propiedades similares al hierro, algunos autores propusieron que el aluminio, al igual que éste, cruza la barrera hematoencefálica a través el receptor de transferrina (Kalaria R, 2002).

El aluminio es un elemento neurotóxico y hay varios mecanismos propuestos que explican su neurotoxicidad, tales como daños a nivel del metabolismo glucolítico, aumento de la peroxidación de lípidos que generan radicales libres, modificaciones en proteínas, consecuencias en la transducción de señales

col., 2006). Grapper y col (1973) que el aluminio induce estrés oxidativo por la generación de radicales libres en la aparición temprana o en la evolución de la enfermedad de Alzheimer en ratones transgénicos (Crapper DR y col., 1973).

2.5. ALUMINIO Y DESÓRDENES DE LA MEMORIA

La asociación entre la intoxicación por aluminio y desordenes en la memoria en humanos fue descrita en 1921 (Spofforth y col., 1921). Más tarde, se demostró que la administración intracerebral del aluminio inducía epilepsia en animales de experimentación.

En 1988, en la ciudad de Camelford (Cornwall, UK) más de 20000 personas sufrieron una intoxicación accidental con aluminio, a causa de contaminación del agua de red. Un estudio a 10 años del hecho (Altmann P y col., 1999), demostró que los residentes que sufrieron la intoxicación con el aluminio poseían síntomas como falta de concentración y pérdida memoria de corto plazo.

2.6. EFECTOS DEL ALUMINIO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Está descrito que el aluminio afecta a más de 200 reacciones biológicamente importantes causando efectos a nivel del sistema nervioso central (Kawahara y col., 2011). Este elemento tiene un único estado de oxidación, Al^{3+} . Al^{3+} tiene afinidad por sitios cargados negativamente. Los fosfatos orgánicos e inorgánicos, carboxilatos y grupos hidróxidos forman fuertes uniones con Al^{3+} . Debido a sus características químicas, el Al^{3+} se une a los grupos fosfatos del ADN y ARN afectando la expresión de varios genes esenciales para funciones cerebrales (Parhad IM y col., 1989). Lukiw y col. Reportaron que niveles nanomolares de Al^{3+} eran suficientes para alterar la expresión génica en neuronas.

El Al^{3+} tiene una velocidad de intercambio con los ligando muy baja comparada con otros metales. Por ejemplo, la velocidad de intercambio del Mg^{2+} es 10^5 veces más rápida que la del Al^{3+} , es por esto que este metal inhibe enzimas que utilizan Mg^{2+} como cofactor. A su vez, el Al^{3+} inhibe aquellos procesos biológicos que involucran rápidos movimientos de Ca^{2+} ya que la velocidad de intercambio del Al^{3+} es 10^8 veces más lenta que la del calcio (Masahiro K y col. 2011).

El aluminio se une a varias proteínas, y puede causar la oligomerización, así mismo, induce cambios conformacionales que impiden el accionar de proteasas. La fuerte unión a aminoácidos fosforilados promueve la agregación y acumulación de proteínas fosforiladas del citoesqueleto, incluyendo neurofilamentos y proteínas asociadas a microtubulos (Diaz-Nido J y col., 1990). En consecuencia, el Al^{3+} provoca la muerte celular por apoptosis en neuronas y células de la glía (Verstraeten y col., 2008).

Debido a sus características, el aluminio produce efectos a distintos niveles en el sistema central. Entre ellos se encuentran:

- *A nivel nuclear y de expresión génica:* El Al^{3+} puede unirse al DNA y a las histonas provocando cambios conformacionales en la cromatina (Lukiw WJ y col., 1987). A su vez, altera la expresión de genes, principalmente los que codifican para los neurofilamentos y la tubulina (Muma NA y col., 1996), para el receptor de transferrina (Oshiro S y col., 1998) y para la ARN polimerasa I (Lukiw WJ y col., 1998). También induce la expresión de genes pro-inflamatorios y pro-apoptóticos (Lukiw y col., 2005). Altera la expresión de genes marcadores de estrés oxidativo y disminuye la expresión del factor de crecimiento neuronal (NGF) y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Johnson VJ y col., 2003).
- *Con respecto al metabolismo energético:* inhibe la actividad de la hexokinasa (Socorro JM y col., 2000), de la fosfofructokinasa y de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Por lo que causa disfunción mitocondrial y depleción de ATP (Kumar y col., 2008; y Lemire y col., 2009).
- *Con respecto al metabolismo energético:* inhibe la actividad de la hexokinasa (Socorro JM y col., 2000), de la fosfofructokinasa y de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Por lo que causa disfunción mitocondrial y depleción de ATP (Kumar y col., 2008; y Lemire y col., 2009).

- **Fosforilación y defosforilación:** Inhibe a proteínas fosfatasa mientras que aumenta la actividad de la proteína kinasa C (Shetty y col., 1992; Johnson y col., 1990). Acelera la fosforilación de MAP2 y la fosforilación y acumulación de neurofilamentos (Troncoso y col., 1990). Inhibe la defosforilación de Tau, mientras que induce la fosforilación no enzimática de Tau (El-Sebae AH y col., 1993).
- **Acumulación anormal de proteínas:** Produce cambios conformacionales y la acumulación de neurofilamentos. Aumenta la fosforilación de Tau y su posterior acumulación en células de neuroblastoma, tanto en modelos celulares primarios como animales (Abd-Elghaffar SK y col., 2005). Además, produce la acumulación de Aβ en cultivos neuronales, en células de neuroblastoma y en modelos animales *in-vivo* (Rodella LF y col., 2008).
- **Liberación de neurotransmisores:** Inhibe la liberación de glutamato por la glutamato deshidrogenasa, inhibe a la acetilcolina transferasa, a la tirosina hidroxilasa y a la glutamato descarboxilasa. Inhibe al receptor tipo glutamato NMDA, la liberación de acetilcolina y la entrada de serotonina y noradrenalina (Canales y col., 2001; Zatta P y col., 2002).
- **Inhibición de canales:** Afecta la actividad de los canales de Na⁺ y de K⁺ (Kanazirska M y col., 1997). Inhibe los canales de Ca²⁺ activados por voltaje (Platt B y col., 1994) y la liberación de Ca²⁺ mediada por IP³ (Pentyala y col., 2010).
- **A nivel de la membrana lipídica:** Acelera la peroxidación lipídica (Oteiza PI, 1994), estimula la peroxidación de los lípidos en los liposomas (Kaneko N y col., 2007). *In-vivo*, induce la peroxidación de lípidos de la mielina y causa alteraciones en los perfiles de lípidos y fosfolípidos de mielina (Pandya JD y col., 2004). Induce cambios en las propiedades físicas de la membrana, principalmente en la fluidez (Verstraeten SV y col., 2002).
- **Muerte celular:** Causa muerte por apoptosis en neuronas y astrocitos (Kawahara M y col., 2003) y produce la muerte del motor neuronal (Shaw CA y col., 2009).

La Fig. 2.3 muestra un esquema de los principales efectos del aluminio sobre el sistema central.

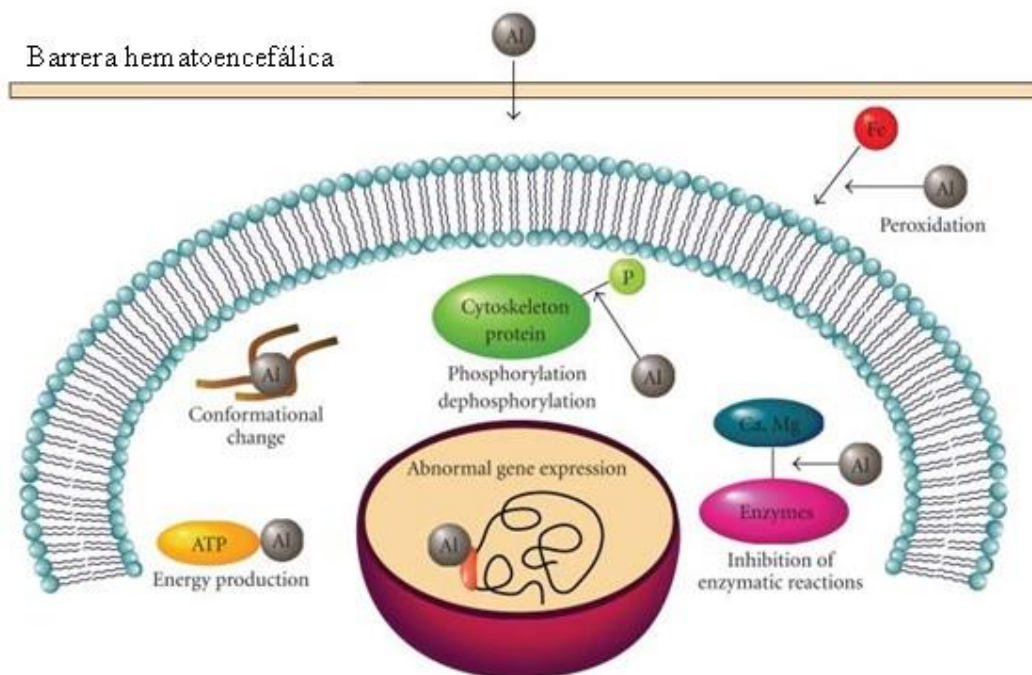


Figura 2.3. Esquema de los principales efectos ejercidos por el aluminio sobre el sistema central. Tomado de Kanawahara v col., 2011

2.7. RELACIÓN ENTRE EL ALUMINIO Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El aluminio promueve la fosforilación de la proteína Tau, lo que la hace menos soluble, aumentando la probabilidad de agregación (Shin RW y col., 1994). La proteína tau es una proteína asociada a los microtúbulos, que se acumula en los ovillos neurofibrilares. Está propuesto que el aluminio interviene en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer porque produce de una menor actividad fosfatasa y un aumento de actividad kinasa a nivel neuronal (Roush W, 1995). A su vez, hay evidencia que el aluminio altera la dinámica de A β (Banerjee C y col., 1997). Se conoce que el centro de las placas amiloides contiene elevada cantidad de A β 42 que es menos soluble que A β 40 (la más abundante). Esto sugeriría la posibilidad de que el clivaje erróneo de A β PP esté muy relacionado. Sin embargo, no hay evidencia certera de que los complejos de Al³⁺ con A β 42, reduzcan su solubilidad, ni aumenten su precipitación como hojas β y faciliten el flujo de A β a través de la barrera hematoencefálica (Exley C, 2006).

En neuronas de ratas (Shigematsu y col., 1992) y conejos (Huang y col., 1997) tratados con aluminio se observaron niveles elevados de A β PP y A β . En la enfermedad de Alzheimer, el patrón más prevalente es la presencia de A β en placas neuríticas. Otros trabajos (Howlett DR, 2003) describen que el aluminio induce modificaciones en estructuras secundarias de componentes no-A β , generando 33% de α -Helice, lo cual le otorga propiedades de resistencia a proteasas.

Mientras que la formación de ovillos neurofibrilares (NFTs) es más bien un producto y no una causa de la muerte neuronal, A β -el principal componente de las placas seniles características en la enfermedad de Alzheimer- es neurotóxico, probablemente porque une en exceso iones metálicos tóxicos. El aluminio es un componente de la placa senil e influye en la agregación y toxicidad de A β (Exley C, 1999). Por lo tanto, si A β está involucrado en la muerte neuronal en Alzheimer, la presencia de Aluminio en el fluido cerebral intersticial podría mediar su acción. Esta mediación puede involucrar a su vez la unión del Al³⁺ a ATP, que está demostrado que promueve la amiloidosis de A β . Se demostró *in vitro* que el aluminio promueve la agregación de A β y la acumulación de A β PP en neuronas y en células gliales.

El aluminio es un catión trivalente que interacciona con grupos ácidos de péptidos, como los A β , y promueve la agregación entre ellos o con otros péptidos. Fue descrito que el aluminio acelera la formación de fibrillas amiloides *in-vitro* (Mantyh y col., 1993). Por otro lado, el aluminio causa cambios conformacionales de péptidos A β a estructuras hojas β , *in-vivo*. Se ha propuesto que los péptidos A β con estructura de hojas β son incorporados directamente en membranas, formando canales, que pueden causar un aumento de Ca²⁺ intracelular y llevar a la muerte celular (Exley C, 2006).

En humanos, una de las primeras evidencias de la relación entre el aluminio y el Alzheimer fue presentada por Candy y col (1986) quienes describen la presencia de aluminio dentro de placas en el cerebro de un paciente con la enfermedad. Recientemente, Yumoto y col (2009) examinaron la presencia de aluminio en autopsias de 5 pacientes con enfermedad de Alzheimer mediante espectroscopia de rayos X con microscopia de transmisión de electrón (TEM-EDX). El análisis con esta técnica permite obtener simultáneamente imágenes de estructuras subcelulares con alta resolución y analizar cuantitativamente pequeñas cantidades de elementos en las mismas estructuras subcelulares. Este estudio demostró la colocalización del aluminio y péptidos A β en fibras amiloides en los centros de placas seniles.

2.8. EL ALUMINIO INDUCE APOPTOSIS, DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ESTRÉS EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

En todas las enfermedades neurodegenerativas hay muerte neuronal y la apoptosis es el principal mecanismo por el cual se produce esta muerte. Recientemente, fue demostrado en ratas, que la exposición crónica a aluminio aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno que, a su vez, están involucradas con la disfunción mitocondrial de varias regiones del cerebro (Kumar V y col., 2008). Estos animales recibían diariamente por vía gástrica 10 mg/kg de aluminio, en forma de lactato de aluminio. Luego de la exposición crónica al tratamiento, disminuyó la actividad mitocondrial, y por lo tanto la síntesis de ATP, y aumentó el daño oxidativo en las proteínas mitocondriales. Savory y col. (1999) muestran que la edad es un factor importante en la susceptibilidad al estrés oxidativo en neuronas y la subsecuente apoptosis, ambos procesos observados en cerebros con Enfermedad de Alzheimer.

La disfunción en la cadena de transporte de electrones producida por el aluminio puede generar daños sobre el ADN, las proteínas y los lípidos mitocondriales, llevando a la apertura de los poros mitocondriales y la posterior muerte neuronal (Halliwell, 1992). En congruencia con esto, en muestras de sustancia negra de pacientes post-mortem con enfermedades neurodegenerativas se observaron niveles disminuidos de complejo I mitocondrial y en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer específicamente, se observó una disminución de niveles de ARNm de citocromo oxidasa I, II y III (Shi Q y col., 2007).

Los cambios mitocondriales, seguidos de estímulos citotóxicos, representan los primeros eventos en la muerte celular apoptótica. Con referencia a ello, el aluminio inhibe el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ produciendo la acumulación de Ca^{2+} mitocondrial. Esto conlleva a la apertura de los complejos de poros mitocondriales que permiten la liberación de Citocromo C y consecuentemente, la activación de la familia de proteasas caspasas y la posterior apoptosis neuronal (Szutowicz A y col., 1998).

El retículo sarco(endo)plásmico (RE) es una organela multifacética que por un lado, regula la síntesis, el plegado y tráfico de las proteínas, y por otro, regula los niveles de calcio intracelulares junto con la membrana plasmática (Mattson MP y col., 2000). La disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} , la expresión de proteínas mutantes y otros tipos de estrés celular, causan la acumulación de proteínas mal plegadas en esta organela, dando como resultado el estrés del RE. El estrés del RE activa una cascada de señalización llamada respuesta a proteínas mal plegadas que estimula a chaperonas que inicia un sistema de degradación de proteínas. Pero, si el estrés es muy prolongado, se activa la procaspasa-12 del RE, que activa a las demás caspasas y a la calpaína para llevar a la apoptosis. De esta forma, la mitocondria, y en menor medida el RE y el núcleo, son organelas que participan en los mecanismos moleculares de apoptosis seguida a un estímulo neurotóxico como la exposición a aluminio (Nakagawa T y col., 2000).

Sobre la base de estas evidencias, el aluminio tiene un rol significativo en la inducción de la apoptosis, la disfunción mitocondrial y el estrés del RE en neuronas, y esta inducción es un paso importante en la patogénesis de la neurodegeneración que se produce en la enfermedad de Alzheimer.

2.9. EL ALUMINIO AFECTA LA HOMEOSTASIS DE CALCIO

Como se mencionó anteriormente, los oligómeros de la proteína A β formados pueden ser incorporados en la membrana celular y actuar como canales de iones (Kawahara, 2010). El flujo de Ca^{2+} al interior celular por estos canales promueve la fosforilación de Tau, la depleción de factores neurotróficos y la formación de radicales libres, en consecuencia se desencadena la muerte neuronal. El aluminio bloquea varios canales de calcio e influye de este modo en la homeostasis del calcio (Ghribi O y col., 2001). Estos estudios llevaron a proponer terapias para la enfermedad de Alzheimer basadas sobre la quelación de metales como aluminio, zinc, cobre y hierro. (Hegde ML y col., 2009). Un posible quelante es el Cloroquinol, que inhibe la oligomerización de A β y disminuye la acumulación de amiloides en el cerebro de animales experimentales. Otro quelante probado en ensayos clínicos, con efectos beneficiosos sobre la severidad de la patología de Alzheimer, es el DFO (Bush AI y col., 2008). El silicato acompleja el aluminio, por lo que reduce su toxicidad y también sería un candidato para la terapia con quelantes (Exley C, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO III

3.1. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS.

Se aislaron membranas a partir de eritrocitos mediante una hemólisis hipotónica de acuerdo a la técnica descrita por González Flecha y col. (1999).

Los glóbulos rojos se separaron por centrifugación a 1000 g durante 10 min y se lavaron con una solución isotónica 150 mM NaCl. La lisis de los eritrocitos se llevó a cabo resuspendiéndolos en 8 veces su volumen de una solución hipotónica: 15 mM de TRIS-K (pH 7.4 a 37 °C) 1 mM EGTA-K. Este quelante permite eliminar la calmodulina endógena unida a la bomba de calcio complejando el Ca^{2+} presente en el medio. Las membranas

de los eritrocitos lisados se separaron por centrifugación a 20000 g durante 25 minutos y se lavaron repitiendo el procedimiento 5 veces. Finalmente se realizó el último lavado en una solución 15 mM MOPS-K (pH 7.4 a 10 °C); 5 μ M CaCl_2 . Las membranas se congelaron a -70 °C hasta el momento de usarlas.

3.2. OBTENCIÓN DE LA PMCA PURIFICADA

La bomba de Ca^{2+} fue aislada a partir de membranas fragmentadas de eritrocitos humanos mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de agarosa-calmodulina según el procedimiento descrito por Roufogalis y col. (1989).

La suspensión de membranas fragmentadas de eritrocitos (alrededor de 300 ml) fue centrifugada a 20000 g durante 30 min. El sedimento se resuspendió en 5 veces su volumen de una solución 300 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM MOPS-K (pH 7.4 a 10 °C), 100 μ M CaCl_2 , 2 mM DTT, 0.5 % p/v $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y 20 % p/v glicerol. El detergente permite la extracción en micelas de todas las proteínas de la membrana. El glicerol estabiliza las proteínas de membrana impidiendo que la alta concentración de detergente las desnaturalice. Los componentes de las membranas no solubilizados se separaron de las micelas por centrifugación a 20000 g durante 30 min. El sobrenadante se sembró en una columna de agarosa-calmodulina, la cual había sido previamente equilibrada con una solución de composición idéntica a la utilizada para la extracción. Este procedimiento de “extracción” fue repetido por segunda vez. La presencia de Ca^{2+} en esta solución permite que la bomba de Ca^{2+} se una a la calmodulina y quede fuertemente retenida en la columna. El resto de las proteínas de membrana que pudieran haber sido retenidas de manera inespecífica, fueron eliminadas mediante el lavado con una solución 130 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM MOPS-K (pH 7.4 a 10 °C), 100 μ M CaCl_2 , 2 mM DTT, 0.005 % p/v $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y 20 % p/v glicerol. Para eluir la bomba de Ca^{2+} se utilizó una solución 130 mM KCl, 10 mM MOPS-K (pH 7.4 a 10 °C), 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.005 % p/v $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y 20 % p/v glicerol. El quelante de Ca^{2+} presente en esta solución disminuye la concentración del ion en la columna de manera que el complejo calmodulina-bomba de Ca^{2+} se disocia y la proteína eluye. Las fracciones que presentaron mayor emisión de fluorescencia a 333 nm –excitadas a 280 nm- y mayor actividad Ca^{2+} -ATPasa, fueron reunidas y conservadas a -180 °C hasta su utilización. La concentración de enzima purificada en la preparación obtenida fue 10 μ g/ml (~80nM). El rendimiento aproximado de la purificación fue 1 μ g de enzima purificada por mg de proteína presente en las membranas aisladas de glóbulos rojos.

3.3. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO DE MUSCULO ESQUELÉTICO DE CONEJO

Se preparan las vesículas enriquecidas en retículo sarcoplásmico a partir de tejido muscular de conejo según la técnica descrita por Champeil y col. (1985). Se extrajo 188,5 g de musculo de espalda y patas traseras de un conejo de 3 meses de edad. Se procede a la homogeneización del tejido en 570 ml de KCl 0,1 M. Esto se repitió 4 veces durante 1 minuto. Luego centrifugó a 20000 g durante 15 minutos. Se filtró el homogenato a través de gasa, para luego centrifugar por segunda vez a 20000g por 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet blanco en 31 ml de sacarosa 0,5 M. La solución obtenida se centrifugó nuevamente a 20000 g durante 30 minutos. Se separó el sobrenadante cuidadosamente ya hay presentes dos tipos de pellets, uno más firme y otro más lábil que puede resuspenderse. Se obtuvieron 28 ml de sobrenadante a los que se les agrego 9,33 ml de KCl 3 M y 9,33 ml de HEPES 50 mM pH 7,00. Se conservó overnight en heladera. Al día siguiente, se realizó una centrifugación a 15000 rpm durante 6 horas. Luego se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en sacarosa 0,3 M, en HEPES 5mM pH 7,00 y KCl 0,1 M.

3.4. EXTRACCIÓN DE SERCA

La enzima fue directamente solubilizada con C₁₂E₁₀ (0.5%) de membranas de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de conejo como describió previamente Andersen y col., (1985). Esta muestra fue diluida 100 veces en el siguiente medio 20% (w/v) glicerol, 120 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10mM MOPS-K (pH 7.4, 4°C), 2mM EGTA. La concentración de proteína luego de la dilución fue 10 µg/ml.

3.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La masa de proteínas presentes en el gel fue evaluada de acuerdo al método descrito por Ball (1986).

Se realizó la electroforesis de las muestras incluyendo en el mismo gel patrones de seroalbúmina bovina. Se tiñó el gel con *Comassie Blue R* y se cortaron las bandas correspondientes a las muestras y a los patrones. El colorante asociado fue eluido incubando las bandas cortadas en 1 ml de una solución 3% SDS, 65% isopropanol y 10% ácido acético, a 37°C durante 18 h. Se midió la absorbancia de esta solución a 595 nm. La cantidad de proteína presente se determinó por interpolación en una curva de calibración construida con los patrones de BSA. La relación entre la absorbancia y la cantidad de proteína fue lineal entre 0.1 y 3 µg.

3.6. PREPARACIÓN DE MICELAS MIXTAS FOSFOLÍPIDO-DETERGENTE

Una cantidad previamente pesada de fosfolípido puro fue disuelta en cloroformo. Dicho solvente fue evaporado en un rotavapor y el film resultante fue resuspendido e hidratado ON con una solución acuosa de C₁₂E₁₀. La preparación micelar resultante (1 mg/ml fosfolípido y 0.3 mg/ml de C₁₂E₁₀) fue sonicada hasta la desaparición de turbidez (entre 2-5 minutos, dependiendo del fosfolípido utilizado).

3.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CA²⁺-ATPASA

Se determinó la actividad Ca²⁺-ATPasa de la PMCA (velocidad de hidrólisis de ATP por unidad de masa de enzima) utilizando un método radiactivo o un colorimétrico según las características particulares del experimento. En todos los casos las determinaciones se llevaron a cabo a 37°C en un medio de reacción compuesto por: 120 mM KCl, 30 mM MOPS-K (pH 7,4 a 25°C), 120 µg/ml C₁₂E₁₀, 20 µg/ml PC, 50 µM EGTA y suficiente MgCl₂ y CaCl₂ tal que las concentraciones de Mg²⁺ y Ca²⁺ libre fueran 1.85 mM y 80 µM. Cuando éstas últimas fueron variables, se agregó la cantidad necesaria para obtener las concentraciones indicadas en las figuras correspondientes. La concentración de enzima fue 0,8 µg/ml (~ 6nM). La concentración de ATP dependió del método utilizado y se indica en cada caso. Las condiciones de la reacción se planificaron de manera tal de que la hidrólisis de ATP no fuera superior a un 10% del total ya que en dichas condiciones, la actividad de la/s bombas es lineal durante el tiempo en el que se mide la reacción. Una muestra en la que el medio ácido para detener la reacción (ver abajo) fue agregado antes que el ATP, se consideró como “blanco” y se restada a todas condiciones. en la que la reacción

3.7.a) Método colorimétrico

La cantidad de Pi liberado fue determinado como describió Fiske and Subarrow (1925) con algunas modificaciones. La reacción de actividad enzimática se dejó transcurrir el tiempo deseado y luego se detuvo por el agregado de 1 ml de una solución 0.277 g/l NaHSO₃, 0.277 g/l Na₂SO₃, 46 mg/ml ácido 1-amino,2-naftol,4-sulfónico, 0.375 M H₂SO₄, 3.75 g/l (NH₄)₂MoO₄ y 0.9% SDS (Dodecilsulfato de sodio). En este medio ácido las proteínas se desnaturalizan y el fosfato es transformado cuantitativamente en fosfomolibdato y este a su vez en óxidos de molibdeno que se cuantifican midiendo su absorbancia a 690 nm. En el caso de que la muestra incluya membranas, el SDS ayuda a su disgregación. Se agregó 1 ml de esta misma solución a patrones conteniendo una masa conocida de fosfato que fueron incubados junto con las muestras a 37°C durante 15 min. Se registró la absorbancia de patrones y muestras a 690 nm.

3.7.b) Método radiactivo

El procedimiento se basa en la determinación del $[32\text{P}]\text{Pi}$ liberado a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, y su transformación en $[32\text{P}]\text{fosfomolibdato de amonio}$, el cual puede ser separado de la mezcla de reacción por extracción con isobutanol (Richards y col., 1978). La reacción se inició por el agregado de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (25 μM concentración final de ATP) al resto de los componentes. Las soluciones fueron previamente incubadas en un baño de agua termostatzado a 37°C. La reacción se detuvo por el agregado de 2,5 ml de una solución de 0,5 % (p/v) $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en ácido perclórico al 5% (v/v), e inmediatamente se agregó 2 ml de isobutanol y se prolongó la agitación 25 s más con el fin de favorecer el proceso de extracción. El ortofosfato se extrae en la fase orgánica como complejo fosfomolibdico en forma cuantitativa. Luego los tubos se centrifugaron durante 5 min a 3.000 rpm. Se tomó 1 ml de la fase orgánica y se mezcló con 2,5 ml de 0,5 N NaOH en viales para conteo. El NaOH destruye el complejo fosfomolibdico amarillo que produce quenching (apagamiento). La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido, RackbetaPharmaciaWallac (Suecia) Oy-1214. De igual forma, se midieron alícuotas de la solución $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ usado en el ensayo, con el objetivo de obtener la actividad específica utilizada. Los valores de blancos de reactivos se obtuvieron agregando la solución de molibdato y ácido perclórico a los tubos conteniendo la PMCA antes de la incorporación de la solución con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. De esta manera, ya que la enzima es inactivada por el ácido previo al agregado de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ es posible cuantificar la cantidad de ^{32}Pi en ausencia de reacción enzimática (tiempo de reacción = 0).

3.8 Determinación del intermediario fosforilado)

Para estudiar los niveles de EP formados (en estado estacionario) se siguió el protocolo descripto por Echarte y col. (2001). La fosforilación se llevó a cabo a 25°C en un medio de reacción que contenía 120 mM KCl, 30 mM MOPS-K (pH 7,4 a 25°C), 2mM MgCl_2 , 70 $\mu\text{g/ml}$ $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ PC, 50 μM EGTA y suficiente CaCl_2 para obtener una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}} = 80 \mu\text{M}$. La reacción se inició por el agregado de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (25 μM final) bajo vigorosa agitación y se detuvo por el agregado de una solución fría de TCA (7% p/v concentración final) luego de transcurrido 1 min. Luego se procedió a aislar a la PMCA del resto de los componentes de la mezcla de reacción con el fin de determinar la concentración de intermediarios fosforilados. Los tubos de reacción se dejaron durante 1 h en baño hielo-agua. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 5 min a 10.000 g, se descartaron los sobrenadantes y los precipitados conteniendo la proteína se lavaron, primero con una solución 10% TCA/50 mM H_3PO_4 , y luego con agua bidestilada. Los precipitados lavados se resuspendieron en buffer muestra y los componentes de la mezcla se separaron mediante SDS-PAGE. Dado que las condiciones de acidez y bajas temperaturas aumentan la estabilidad del intermediario fosforilado, la electroforesis fue llevada a cabo a pH 6,3 y 14°C, en un gel 7,5% T y 1% C; el buffer anódico y catódico fue el mismo y estaba compuesto por: 175 mM MOPS-Tris pH 6,5 y 0,1% SDS. La corrida se desarrolló a 14°C a 80 V durante 10 min y luego a 100 V hasta que el frente de corrida alcanzara 10 cm desde el punto de siembra. El gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R al 0,05 % disuelto en una mezcla 25% isopropanol y 10% ácido acético. La decoloración de los geles fue realizada mediante sucesivos lavados con una mezcla de 50% metanol y 10% ácido acético. Luego el gel se secó y se expuso a una placa Storage PhosphoScreen (de Molecular Dynamics, AmershamPharmaciaBiotech) para obtener la autorradiografía del mismo. A partir de las imágenes digitales de la autorradiografía y de la tinción del gel, se determinó la intensidad de las bandas correspondientes utilizando el programa GelProAnalyzer. De esta manera se pudo calcular la relación EP/PMCA y cada condición se relacionó al valor de EP obtenido en ausencia de AlCl_3 (control) que fue tomada como 100%.

3.9. ESTUDIO DEL FLUJO DE CALCIO EN CULTIVO DE CÉLULAS HEK293T

3.9.a) Cultivo de células HEK293T

Las células HEK293T provienen de la transformación de un cultivo de células renales embrionarias humanas (Graham y col., 1977) y son utilizadas en la caracterización de comportamientos celulares generales. Poseen varias ventajas que las hacen un sistema de elección para dichas aplicaciones tales como la facilidad con que crecen y pueden ser transfectadas. En nuestro caso particular, además, la fácil adhesión a la superficie de los frascos y/o placas donde se llevaron a cabo los experimentos y la formación de monocapas cuentan entre los requerimientos necesarios de nuestros protocolos de medida y que estas células cumplen.

La estrategia experimental que se utilizará en este proyecto para estudiar el flujo de calcio se basó en la descrita por la Dra. Dalghi con ciertas modificaciones (Tesis Doctoral, 2013).

3.9.b) Mantenimiento del cultivo de células HEK293

Las células HEK293T utilizadas en este trabajo fueron cedidas por el Dr. Osvaldo Rey. El cultivo de células se llevó a cabo en frascos de 25 cm² de superficie en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) suplementado con 10% suero fetal bovino y 1X aminoácidos no esenciales (Invitrogen, Cat. Nº 11140-050). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera controlada con 5% CO₂. Se controló el crecimiento y la ausencia de contaminación microbiana a diario. Cuando el cultivo alcanza la confluencia, se realiza el pasaje de células a un nuevo frasco en una dilución 1/10. Para ello, se aspiró por vacío el medio de cultivo, se agregó 1 ml de 0,2% tripsina (sigma T4799 de páncreas porcino; 2 g tripsina y 0,8 g EDTA pH 7,4, en 1000ml de PBS) y luego de 3 min de contacto se agregaron 4 ml de medio. Se colocó 0.5 ml de dicha suspensión en un frasco nuevo y se agregaron 5 ml de medio fresco. Este procedimiento se realizó entre 2 a 3 veces por semana.

3.9.c) Plaqueo de células HEK293T en placas de 96 pocillos

Para las determinaciones funcionales se utilizó una placa de 96 pocillos negra con la base plana, transparente y estéril (Costar) a la cual se le agregó 100 µl/pocillo de una suspensión de células HEK (15.000 células/100 µl). La suspensión se preparó a partir de la tripsinización de un cultivo confluyente como se describió anteriormente.

3.9.d) Determinación del flujo de calcio.

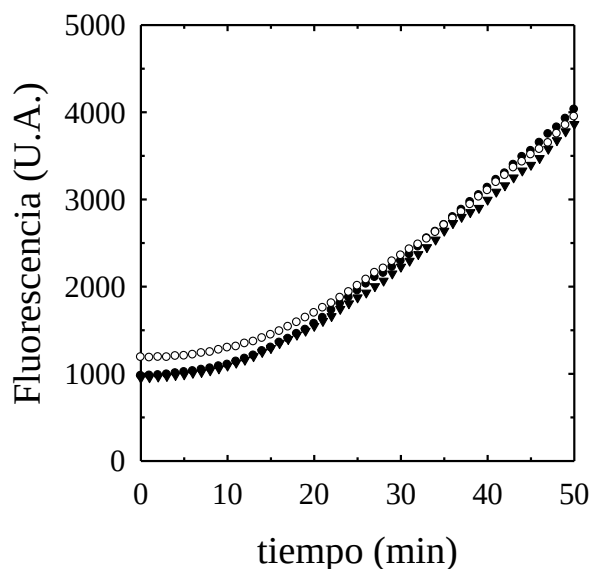
El nivel de calcio citoplasmático fue determinado por la técnica de imágenes de calcio (livecell ion imaging) cargando las células con un fluoróforo sensible a Ca²⁺ (Fluo4) y monitoreando la señal en tiempo real a través de un lector de placas que toma imágenes de fluorescencia (Sinergy HT. Biotek).

3.9.e) Carga del fluoróforo

Las células fueron cargadas con 2 µM de Fluo4-AM (Molecular probes) en un buffer compuesto por: 120 mM Cloruro de colina, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM D-glucosa, 10 mM Hepes pH 7,4 a 37°C (buffer de reacción). La carga se realizó durante 50 min a 37°C según lo descrito por Davis y col., 2012.

La determinación de Ca²⁺ intracelular mediante el uso del fluoróforo Fluo4-AM es una técnica que utiliza la propiedad de los acetoximetilesteres de los fluoróforos para penetrar en la célula. El fluoróforo entra la célula donde es clivado por esterasas intracelulares y queda retenido en su forma libre (Fluo4) en el interior celular.

En la Fig. 3.1 se observa la entrada del Fluo4 a las células HEK293T como un aumento de la fluorescencia en el tiempo.



Una vez transcurrido el tiempo indicado, las células fueron lavadas dos veces con la solución de reacción y finalmente se agregó 100 μ l de dicha solución en cada pocillo.

Antes de realizar la determinación, las células cargadas fueron incubadas por 30 minutos a 37°C con el objetivo de permitir la completa de-esterificación intracelular del Fluo4-AM. La señal fluorescente ($\lambda_{ex} = 470$ nm y $\lambda_{em} = 515\text{--}513.5$ nm) se registró en cada pocillo simultáneamente en tiempo real (intervalo de tiempo entre lecturas: entre 1 a 5 s).

Con el fin de realizar los controles de fluorescencia máxima y mínima (controles internos en cada experimento), las células fueron expuestas a un medio conteniendo ionomicina (fluorescencia máxima) o ionomicina más 10 mM EGTA en un medio libre de calcio (fluorescencia mínima).

3.10 Determinación del flujo de Ca^{2+} en células HEK293T mediado por PMCA

Para poder evaluar la entrada y remoción del Ca^{2+} intracelular mediada principalmente por la PMCA, se debió primero estimular su entrada al citosol. Para ello se expuso a las células a tapsigargina (TG) y posteriormente se agregó Ca^{2+} al medio extracelular; este tratamiento produce la inhibición de la SERCA con la consiguiente depleción de Ca^{2+} del retículo endoplásmico; esto a su vez estimula la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular por los canales SOC.

Para aplicar esta estrategia experimental se prepararon las placas de 96 pocillos de acuerdo a lo descrito anteriormente, y soluciones de TG y CaCl_2 . Como el equipo utilizado para estas determinaciones cuenta con inyectores automáticos la exposición de las células a TG y CaCl_2 fueron realizadas de manera automática utilizando los inyectores del equipo. Para ello se utilizaron soluciones 10 X de TG y CaCl_2 preparadas en buffer de reacción. El protocolo de inyección (volumen, altura de carga y de descarga, flujo de carga y de descarga, tiempo entre dos cargas) se estableció utilizando el software con que opera el equipo

(software Gen 5 2.01). El esquema básico de trabajo consistió en el agregado de 10 µl de TG 10X (o buffer para la condición control) en cada pocillo de la placa que contenía las células (previamente cargadas con Fluo4) y luego de ~5 min se realizó el agregado de 10 µl de CaCl₂ 10 X (o buffer para la condición control) a cada pocillo conteniendo células. La señal fluorescente fue registrada en cada pocillo simultáneamente en tiempo real (intervalo de tiempo entre lecturas: entre 1 a 5 s).

3.11. Ajustes de curvas y estimación de parámetros

Las ecuaciones fueron ajustadas a los resultados experimentales mediante un procedimiento de regresión no lineal basado en el algoritmo de Gauss-Newton (Fraser & Suzuki, 1973), utilizando programas comerciales (Excel 7.0 for Windows y Sigma-Plot 10.0 para Windows, siendo este último capaz de proporcionar no solo los mejores valores de ajuste de los parámetros, sino también sus errores estándar). La ecuación que proporcionó el mejor ajuste se seleccionó sobre la base del menor desvío estándar de la regresión y en base del Criterio de información asintótico corregido (AICc) de Akaike. La generación de soluciones analíticas o numéricas para los modelos planteados se llevaron a cabo utilizando el programa Copasi 4.16 (University of Virginia, Hoops y col., 2006).

3.12. Origen y calidad de las drogas utilizadas

La sangre recientemente extraída fue cedida por la Fundación Fundosol (Argentina). Las drogas que se utilizaron para la preparación de las soluciones y *buffers* fueron adquiridas a Sigma Chemical Co (St Louis, Missouri, USA). Poli(oxietilen) 10-lauril eter (C₁₂E₁₀) fue obtenido de Sigma Chemical (St. Louis, MO). El [γ -³²P]ATP fue provisto por Perkin Elmer LifeSciences.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO IV

4.1. EFECTO DEL CA²⁺ Y MG²⁺ SOBRE LA PMCA Y LA SERCA

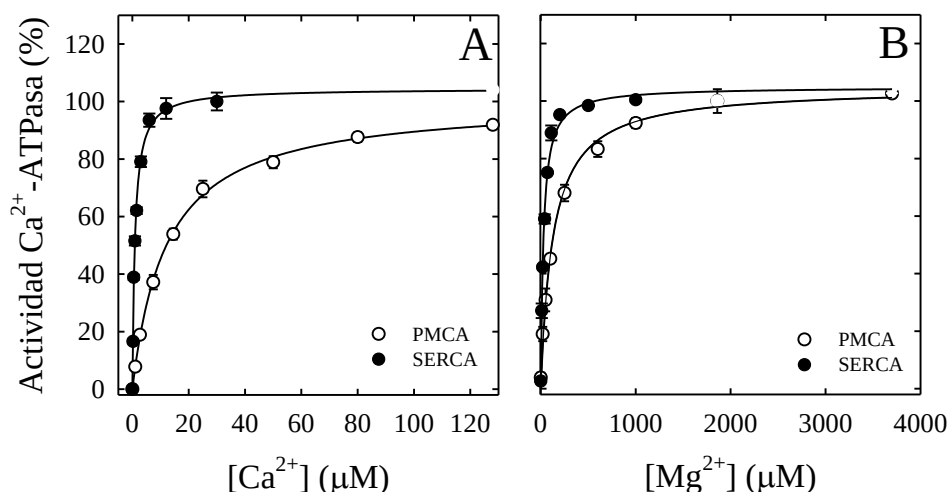
Aunque con una estequiometría diferente, tanto la SERCA como la PMCA transportan Ca²⁺ y utilizan Mg²⁺ como cofactor. La afinidad aparente de ambas bombas por estos dos iones es diferente y pueden verse afectadas por el medio de reconstitución, el pH y/o la fuerza iónica (Nigli y Sigel, 2008).

La Fig. 4.1 muestra la actividad Ca²⁺-ATPasa de la PMCA y la SERCA en función de concentraciones crecientes de Ca²⁺ libre (A) o Mg²⁺ libre (B). En todos los casos, la línea llena representa el ajuste de la ecuación 4.1 a los datos experimentales.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [x]}{K_x + [x]} \quad \text{Ec. 4.1}$$

En ella, $V_{\max}$ es la velocidad máxima, x la concentración de Ca²⁺ o Mg²⁺ y K_x es la concentración de estos iones a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima (K_{Ca} o K_{Mg}).

La Tabla 4.1 muestra los valores obtenidos para K_{Ca} y K_{Mg} en la PMCA y la SERCA, respectivamente. La afinidad aparente por Ca²⁺ y por Mg²⁺ fue mayor en la SERCA que en la PMCA. A partir de estos resultados, definimos como “concentraciones de Ca²⁺ y Mg²⁺ óptimas” para ambas bombas (Tabla 3.1).



4.2. EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE LA ACTIVIDAD Ca^{2+} -ATPASA

La PMCA y la SERCA fueron incubadas con distintas concentraciones de AlCl_3 y en presencia de cantidades óptimas de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Tabla 4.1). Luego de 10 minutos, la reacción se inició por el agregado de 2 mM ATP y se detuvo luego de 5 min en el caso de la SERCA y de 30 min en el caso de la PMCA.

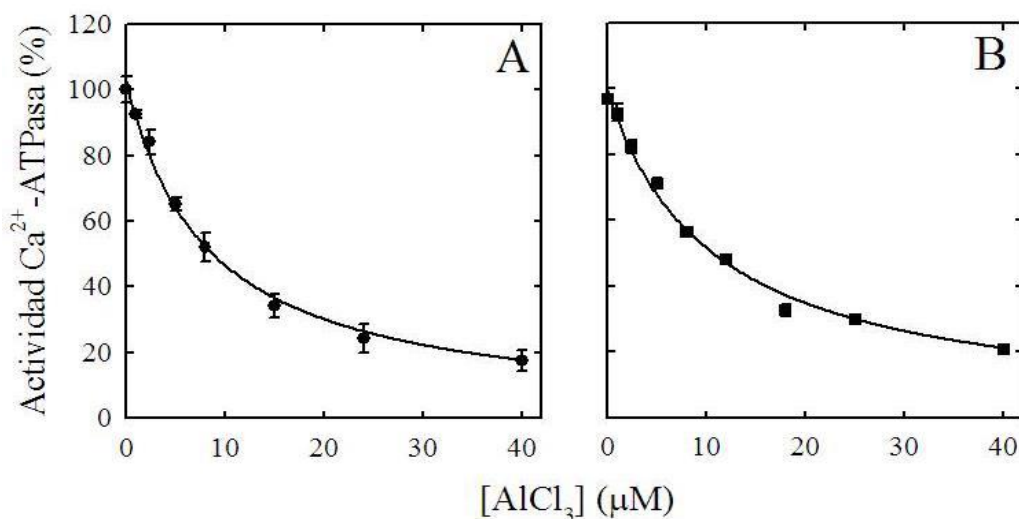


Figura 4.2: Actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) de la PMCA (A) y de la SERCA (B) en función de $[\text{AlCl}_3]$. La línea llena muestra el ajuste de la Ec. 4.2 a los datos experimentales. Las constantes de inhibición aparentes (K_{AI}) obtenidas fueron: $8,3 \pm 0,5 \mu\text{M}$ para la PMCA y $10,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$ para la SERCA. Experimento representativo de

La actividad de ambas Ca^{2+} -ATPasas disminuyó en función del aumento de la concentración de AlCl_3 . Los datos experimentales fueron descriptos por la ecuación 4.2

$$v = \frac{V_0 \cdot K_{Al}}{K_{Al} + [Al]}$$

En donde V_0 es la actividad Ca^{2+} -ATPasa en ausencia de AlCl_3 , $[Al]$ es la concentración de AlCl_3 y K_{Al} es la concentración de AlCl_3 a la cual se observa el 50% de la actividad inicial.

Los valores de K_{Al} obtenidos fueron $8,3 \pm 0,5 \mu\text{M}$ y $10,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$ para la PMCA y la SERCA, respectivamente. Estos resultados muestran que la actividad Ca^{2+} -ATPasa de ambas bombas es inhibida por AlCl_3 con una constante de inhibición aparente similar.

4.3. EFECTO DEL TIEMPO DE PREINCUBACIÓN DE LA ENZIMA CON ALUMINIO

Con el propósito de obtener información sobre el mecanismo por el cual el Aluminio inhibe a la PMCA y a la SERCA, estudiamos el efecto del tiempo de preincubación de la enzima con AlCl_3 antes de medir la actividad Ca^{2+} -ATPasa.

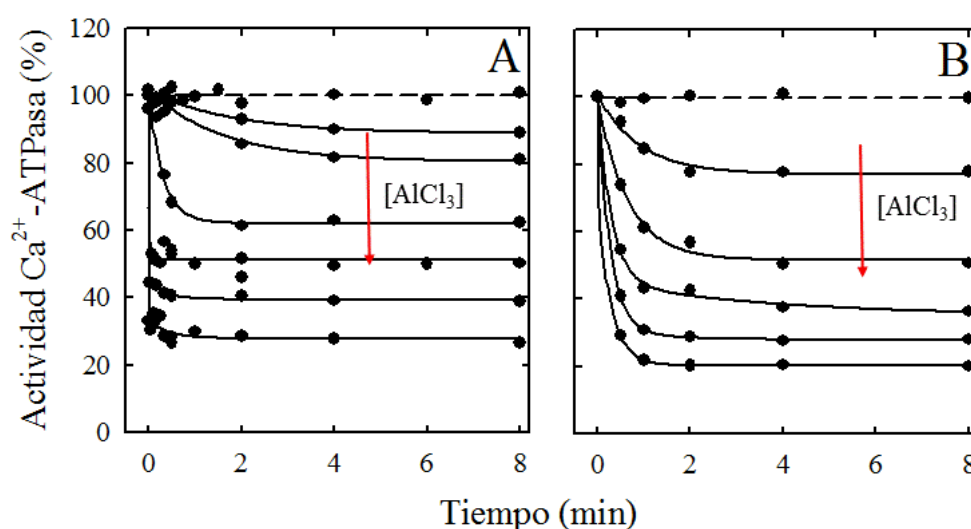


Figura 4.3: Actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) de la PMCA (A) y de la SERCA (B) en función del tiempo de preincubación con distintas $[\text{AlCl}_3]$. La flecha muestra la dirección en la que aumenta la $[\text{AlCl}_3]$. La línea llena corresponde al ajuste de las Ec. 4.3 o 4.4 a los datos experimentales (Ver detalle en el texto). La línea punteada muestra el valor promedio de la actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) en ausencia de $[\text{AlCl}_3]$ en el mismo periodo de tiempo. La actividad Ca^{2+} -ATPasa sin preincubación y en ausencia de AlCl_3 fue considerada como 100%. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Para esta estrategia, la enzima (PMCA o SERCA) fue reconstituida en condiciones óptimas y preincubada durante distintos tiempos con distintas concentraciones de AlCl_3 . Luego de cada tiempo de preincubación, se inició la medida de la actividad Ca^{2+} -ATPasa mediante el agregado de ATP, y se frenó la reacción luego de 5 min. En SERCA o 35 min en PMCA.

La Fig. 4.3 muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA (A) y de la SERCA (B) en función del tiempo de preincubación del AlCl_3 con la enzima. Cuando la concentración de AlCl_3 está por debajo de $8 \mu\text{M}$, los datos experimentales son descriptos por una función exponencial simple (4.3)

$$v = v_{\infty} + ae^{-k_{obs1} \cdot t}$$

Donde, v_{∞} es la actividad cuando el tiempo de preincubación con AlCl_3 (t) tiende a infinito, a es el cambio en la actividad Ca^{2+} -ATPasa entre $t = 0$ y $t = \infty$ (la amplitud de la curva) y k_{obs1} es la constante de velocidad observada

Cuando la concentración de AlCl_3 es mayor a $8 \mu\text{M}$, en ambas bombas el mecanismo es más complejo. En estos casos, el comportamiento fue descrito por una ecuación que incluye la suma de dos ecuaciones exponenciales (Ec. 4.4). En ésta los parámetros b y k_{obs2} corresponden al cambio en la actividad Ca^{2+} -ATPasa y a la constante de velocidad observada en la primera exponencial.

$$v = v_{\infty} + be^{-k_{obs2} \cdot t} + ae^{-k_{obs1} \cdot t} \quad \text{Ec. 4.4}$$

Esta primera exponencial, o primera fase, ocurre en tiempos muy inferiores a los que podemos medir con esta estrategia experimental ya que cuando la preincubación es durante 1 seg la actividad de la enzima es similar a la obtenida en tiempos mayores.

4.3.a) La primera fase (fase rápida) desaparece cuando el aluminio es preparado a pH 7.2

El aluminio en solución se encuentra complejoado con moléculas de agua. Esta forma es conocida como aluminio libre (Al^{3+}) y está favorecida a pH ácidos. A medida que el pH aumenta, el aluminio se encuentra formando complejos con OH^- provenientes de la desprotonación de las moléculas de agua ($\text{Al}(\text{OH})_n$). A pH neutro (≈ 7.2) la mayoría del aluminio se encuentra formando complejos hidroxilados, más específicamente, como $\text{Al}(\text{OH})_4^-$. La liberación de protones para formar estos complejos, produce una acidificación del medio por lo que una solución de AlCl_3 en agua tiene un pH por debajo de 6.2 (pH del agua).

En nuestra estrategia experimental, la preincubación de la enzima(s) con AlCl_3 se inicia cuando entran en contacto una solución (en agua) de la concentración de AlCl_3 necesaria y la bomba reconstituida en condiciones óptimas (pH 7.2). Por lo tanto, la aparición de esa fase rápida a mayores concentraciones de AlCl_3 podría relacionarse con las distintas formas en que el aluminio se encuentra en esa solución acuosa. Es decir, durante el período de tiempo que el sistema tarda en alcanzar el equilibrio dado por las nuevas condiciones de pH, la enzima(s) puede estar en contacto con una concentración de Al^{3+} diferente a la del estado final del sistema.

Para evaluar esta hipótesis, lo primero que hicimos fue determinar el pH de las soluciones acuosas de AlCl_3 utilizadas y el pH del medio de reacción luego del agregado de éstas. Efectivamente el pH de las soluciones de Aluminio varía entre 6.2 (pH del agua utilizada) y 4.7 para una solución $75 \mu\text{M}$ AlCl_3 (esta solución corresponde a la utilizada para alcanzar una concentración final de AlCl_3 de $25 \mu\text{M}$). El agregado de estas soluciones no modifica el pH del medio de reacción, que es rápidamente amortiguado por la presencia de buffer (MOPS 50 mM, pH 7.2)-.

A partir de las constantes de equilibrio (Martin, 1986a), calculamos como varía la concentración de Al^{3+} en función de la concentración de AlCl_3 en una solución acuosa y en un *buffer* a pH 7.2 (Fig. 4.4). Cuando el pH es amortiguado por el *buffer*, la concentración de Al^{3+} es proporcional a la concentración de AlCl_3 agregada al medio. Sin embargo, en una solución acuosa, la relación entre las concentraciones de Al^{3+} y AlCl_3

ya no es lineal. Por lo tanto, la aparición de la fase rápida a mayores concentraciones de nuestra hipótesis, por un lado, disolvimos la cantidad necesaria de AlCl_3 en un *buffer* de pH 7.2 y evaluamos el efecto del tiempo de su preincubación con la enzima. Si nuestra hipótesis era correcta, bajo este tratamiento, todos los datos experimentales debían poder describirse con la Ec. 4.3. La Fig. 4.5 muestra que, efectivamente, tanto en la PMCA (A) como en la SERCA (B), la actividad Ca^{2+} -ATPasa en función del tiempo de preincubación con AlCl_3 es descripto por una exponencial simple (Ec. 4.4), lo que sugiere que nuestra hipótesis es correcta.

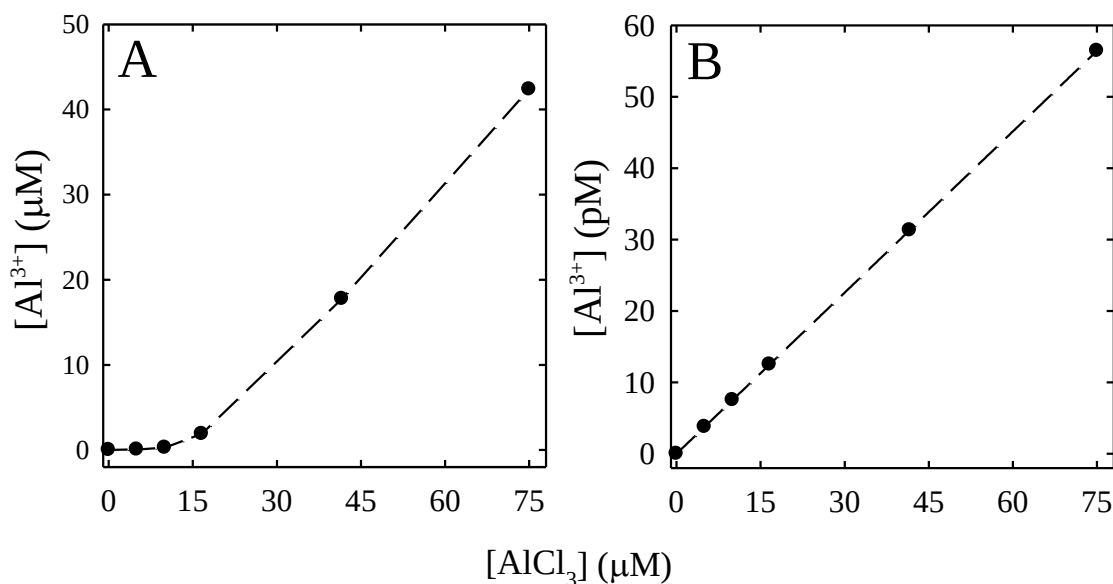


Figura 4.4: Concentración de Al^{3+} en función de la concentración de AlCl_3 en una solución acuosa (pH variable) (A) o en *buffer* MOPS 50 mM, pH 7.2 a 25°C (pH constante) (B). La concentración de Al^{3+} fue calculada como describió Martin (1986a) para cada concentración de AlCl_3 y el pH determinado experimentalmente.

En el caso de la PMCA, el valor de actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de 8 o 20 μM AlCl_3 preparado a pH 7.2 fue similar al obtenido a cuando éste se preparó en agua (Fig. 4.3A), lo que sugiere que la enzima puede unirse a la misma cantidad de inhibidor aunque el proceso sea más lento. En la SERCA, la actividad Ca^{2+} -ATPasa remanente es menor cuando el AlCl_3 es preparado a pH 7.2. Esto no significa que si transcurriera el tiempo necesario el equilibrio que alcance el sistema, —es decir, la cantidad de enzima inhibida— sea el mismo, pero en el tiempo evaluado, las dos bombas se comportan diferente (este punto se retomará más adelante).

Por otro lado, disolvimos el AlCl_3 en *buffer* con distintos pH, de tal forma que la concentración de AlCl_3 fuera constante (20 μM para la PMCA y 40 μM para la SERCA) pero la de Al^{3+} fuera variable. Estas soluciones fueron agregadas y preincubadas (7 min.) con la enzima en un medio óptimo (pH 7.2). De esta manera, si bien el AlCl_3 fue disuelto a distintos pH, la preincubación y la Ca^{2+} -ATPasa fueron determinadas a pH 7.2.

La Fig. 4.5 muestra los resultados obtenidos para la PMCA (C) y la SERCA (D). La actividad Ca^{2+} -ATPasa de ambas bombas es inhibida cuando el AlCl_3 es disuelto a pH inferior a 6 pero, a medida que el pH se acerca a la neutralidad, la inhibición disminuye. Este comportamiento es más evidente (o marcado) en la SERCA, dónde a pH 6.5 la inhibición es un 50% menor que a pH más ácidos y a pH 7.4 no se observa inhibición. En ausencia de AlCl_3 , la actividad Ca^{2+} -ATPasa de ambas bombas no fue afectada significativamente por el tratamiento, lo que demuestra que el efecto observado en presencia de AlCl_3 es producido por éste y no por el pH de la solución en el que está disuelto. Si consideramos que la concentración de AlCl_3 fue constante pero la de Al^{3+} aumenta al disminuir el pH, estos resultados sugieren que la forma que produce la inhibición de la PMCA y la SERCA es el Al^{3+} .

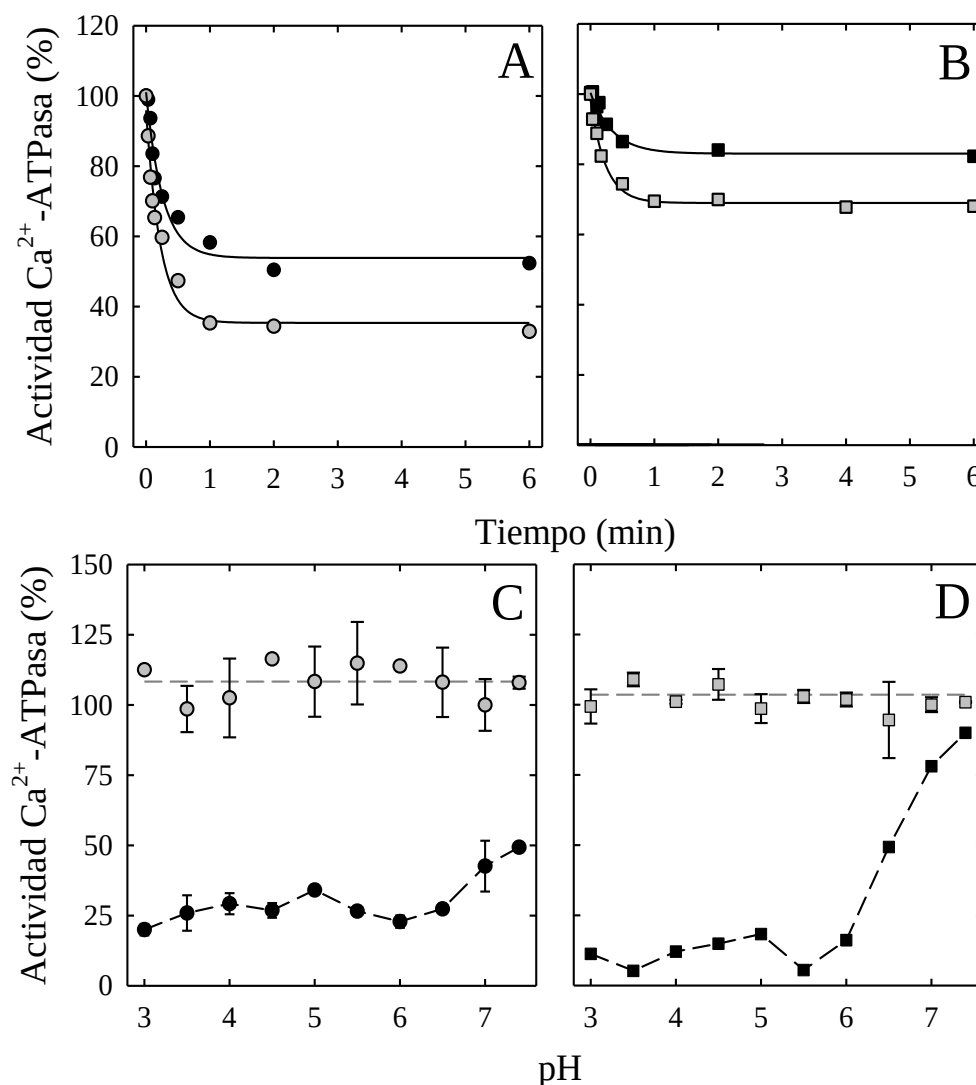


Figura 4.5: Actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) de la PMCA (A) y la SERCA (B) en función del tiempo de preincubación con una solución 10 μM (círculos/cuadrados negros) o 20 μM (círculos/cuadrados grises) AlCl_3 preparada a pH 7.2. En todos los casos, la línea llena representa el ajuste de la Ec. 4.3 a los datos experimentales. Experimento representativo de 2 experimentos independientes. Actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) de la PMCA (C) y de la SERCA (D) en ausencia (círculos/cuadrados grises) o presencia (círculos/cuadrados negros) de una solución 20 o 40 μM AlCl_3 preparada a diferentes pH (abscisas). La línea gris en ambos paneles representa el valor promedio de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de ambas bombas. Valores $\pm$ ES de un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

Este resultado no se limita a mostrar que la aparición de la fase rápida se relaciona con el diseño experimental, sino que permite obtener información acerca del sistema. Cuando la enzima(s) entra en contacto con el AlCl_3 , la inhibición ocurre en un tiempo que dependería de la concentración de Al^{3+} presente. De esta forma, cuando la concentración de este catión es suficiente, la enzima(s) se inhibe muy rápidamente, es decir que, el tiempo que tarda en alcanzarse el equilibrio en las Fig. 4.5A y B, no estaría limitado por un proceso inherente de la enzima (como un cambio conformacional) sino de la capacidad de los distintos equilibrios presentes de liberar Al^{3+} al medio (particularmente importantes a pH neutro).

4.3.b) La inhibición de la SERCA y la PMCA por Al^{3+} solo ocurre en ausencia de ATP

En ausencia de ATP, estas bombas se encuentran en un equilibrio entre las conformaciones conocidas como E_1 y E_2 . Este equilibrio puede desplazarse hacia una u otra forma según la presencia de distintos componentes. En presencia de ATP (además de Ca^{2+} y Mg^{2+}), estas bombas pueden transportar Ca^{2+} mediante un ciclo de reacción que involucra la “interconversión” entre distintos intermediarios que poseen características cinéticas y estructurales definidas. Este estado, en el que las bombas transportan Ca^{2+} , e hidrolizan ATP, a velocidad constante se conoce como “estado estacionario”.

La Fig. 4.6 muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) de la PMCA (A) y de la SERCA (B) en función de la concentración de AlCl_3 cuando el tiempo de preincubación es “cero”.

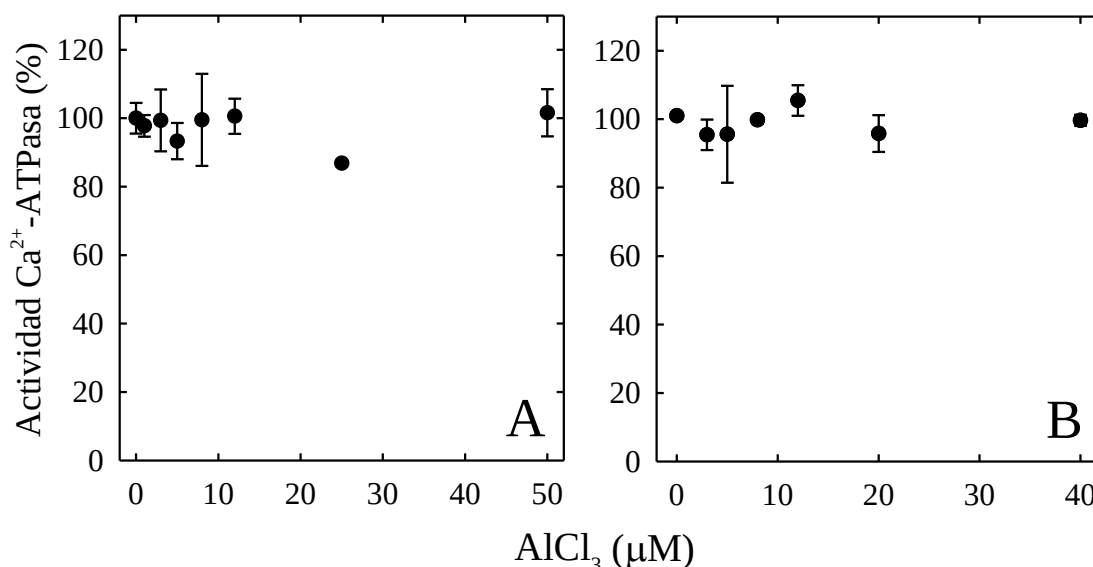


Figura 4.6: Actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) de la PMCA (A) y la SERCA (B) en función de la concentración de AlCl_3 sin incubación previa al agregado de ATP. La figura muestra el promedio $\pm$ SE de 2 experimentos independientes realizados por duplicado.

En este diseño experimental, las bombas fueron incubadas en condiciones óptimas pero la solución de AlCl_3 –de la concentración correspondiente– fue agregada inmediatamente después de iniciar la reacción con ATP. Este resultado demuestra que la inhibición de ambas bombas sólo ocurre cuando existe un periodo de preincubación en ausencia de ATP. Es decir, cuando las bombas comienzan a ciclar y transportar Ca^{2+} , ya no se produce la inhibición por Al^{3+} , independientemente de la concentración agregada.

4.3.c) En ausencia de ATP, el Al^{3+} se disocia lentamente de la SERCA y la PMCA

En un sistema en equilibrio, el hecho de que la actividad Ca^{2+} -ATPasa de las bombas alcance un valor distinto de “cero” cuando el tiempo de preincubación con AlCl_3 tiende a infinito sugiere que la unión del Al^{3+} a la(s) bomba es un proceso reversible (Fig. 4.3 y 4.4). Sin embargo, el hecho de que sea reversible no nos dice nada acerca de la estabilidad o de la velocidad con la que el complejo Enzima- Al^{3+} se asocia o disocia.

Para investigar la disociación (o estabilidad) del complejo Enzima- Al^{3+} , utilizamos más de un diseño experimental. En el primero de ellos, recurrimos al efecto del pH sobre la cantidad de Al^{3+} . Para ello, ambas enzimas fueron preincubadas en condiciones óptimas con $8 \mu\text{M}$ de AlCl_3 a pH 6.2 durante 5 min. Según los

resultados mostrados en la Fig. 4.3, en estas condiciones ese tiempo es suficiente para que el sistema se estabilice. Luego de ese tiempo, distintas alícuotas fueron llevadas a diferentes pH -por el agregado de un buffer concentrado- e incubadas durante 5 min. Luego se inició la reacción de actividad mediante el agregado de ATP.

La Fig. 4.7 muestra los resultados obtenidos en la PMCA (A) y para la SERCA (B). Si bien la actividad Ca^{2+} -ATPasa de ambas bombas es sensible al pH, en coincidencia con resultados previos (Yu y col., 1993) la actividad de la SERCA es inhibida rápidamente a pH alcalinos. También se observa que la actividad óptima de la SERCA es a pH ligeramente ácido, mientras que la PMCA tiene una mayor actividad a un pH cercano a la neutralidad. Posiblemente esto se relacione con los entornos nativos de ambas bombas, la PMCA funciona al pH citoplasmático mientras que la SERCA está expuesta al interior del retículo sarcoendoplasmático, cuyo pH es inferior a 6. Por otra parte, estas bombas transportan Ca^{2+} y cotransportan protones (Yu y col, 1993; Luoni y col, 2000) por lo que el pH tiene un efecto extra relacionado con la concentración de ion cotransportado durante el ciclo de reacción.

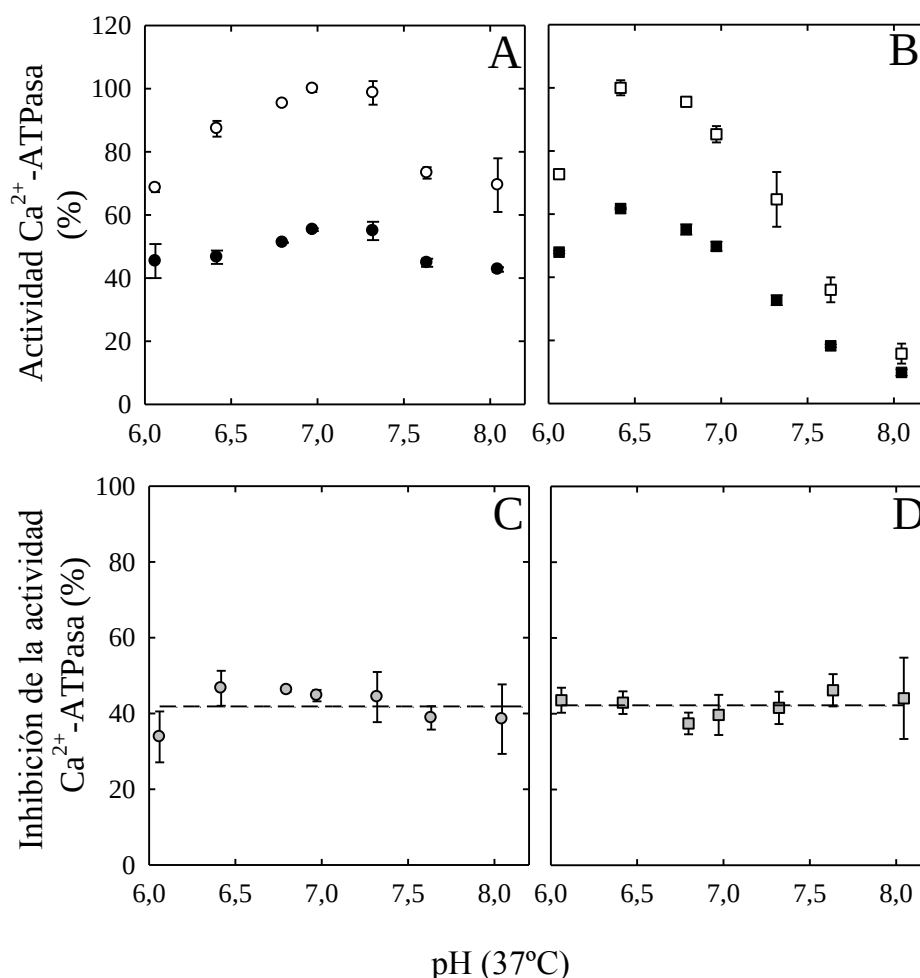
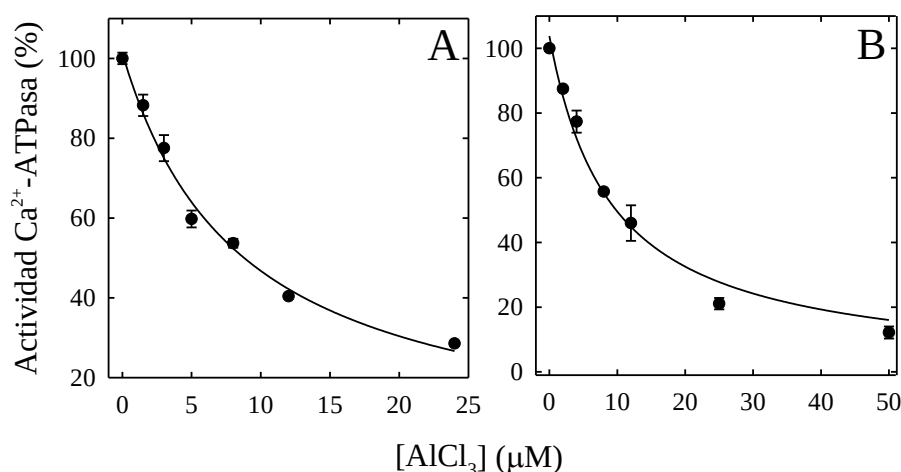


Figura 4.7: Actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) de la PMCA (A) y la SERCA (B) en presencia (círculos y cuadrados negros) y ausencia (círculos y cuadrados blancos) de $8 \mu\text{M AlCl}_3$ y en función del pH al que se determina la reacción. La actividad máxima obtenida al pH correspondiente para cada bomba fue tomada como 100%. (C) y (D) Porcentaje de inhibición calculado a partir de A y B en la PMCA y la SERCA, respectivamente. La figura es representativa de 2 experimentos independientes realizados por duplicado.

En ambas bombas, la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de $8 \mu\text{M}$ AlCl_3 tiene un comportamiento similar al observado en ausencia de éste. Consecuentemente, el “porcentaje de inhibición” también es similar independientemente del pH al que se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa (C y D).

Para la segunda estrategia, la PMCA fue reconstituida en condiciones óptimas y preincubada durante 8 min con distintas concentraciones de AlCl_3 . Luego de ese tiempo se agregaron $5 \mu\text{l}$ de EGTA 25 mM (2.5 mM final), se incubó durante 5 min y se inició la medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa por el agregado de ATP y CaCl_2 tal que las concentraciones finales de ambos fuera 2 mM y $70 \mu\text{M}$, respectivamente. Los resultados sólo son mostrados en la PMCA porque fueron similares en la SERCA.

El EGTA tiene muy alta afinidad por el Al^{3+} , la K_D para el complejo EGTA- Al^{3+} es de 4.5×10^{-10} mientras que para la K_D para el complejo EGTA- Ca^{2+} es de 3.8×10^{-7} a pH 7 (www.maxchelator.stanford.edu). La Fig 4.8A muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA determinada con esta estrategia experimental. La línea llena representa el ajuste de los datos experimentales a la Ec. 4.2. La K_{AI} obtenida en este caso fue $8.6 \pm 0.7 \mu\text{M}$



En los experimentos mostrados hasta acá, la enzima es preincubada en un volumen de $490 \mu\text{l}$ y la medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa es iniciada por el agregado de $10 \mu\text{l}$ de ATP 100 mM . Esto significa que en estado estacionario la enzima está en contacto con aproximadamente la misma concentración de AlCl_3 que en la preincubación. Por lo tanto, el tercer diseño experimental que utilizamos para evaluar la estabilidad del complejo Enzima- Al^{3+} , consistió en preincubar las enzimas con las concentraciones de AlCl_3 correspondientes, pero determinar la actividad Ca^{2+} -ATPasa en condiciones donde dicha concentración fuera considerablemente menor.

De esta manera, la PMCA fue reconstituida en condiciones óptimas y preincubada durante 8 min con distintas concentraciones de AlCl_3 en un volumen de $150 \mu\text{l}$. Luego de ese tiempo, se agregaron $440 \mu\text{l}$ de una solución conteniendo ATP y el resto de los componentes (excepto AlCl_3), tal que las concentraciones finales de todos ellos fueran las mismas que en las estrategias anteriores, y se incubó durante 5 min. Finalmente, se inició la medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa por el agregado de ATP. De esta forma, las concentraciones de AlCl_3 mientras la bomba está ciclando son diluidas 4 veces respecto de la condición de equilibrio.

El resultado obtenido se muestra en la Fig. 4.8B. Las concentraciones de AlCl_3 en el eje de las ordenadas corresponden a las presentes durante la preincubación. Los datos experimentales son descritos por la Ec. 4.2 y la K_{AI} obtenida fue de $9.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$.

En coincidencia con la lenta velocidad de disociación del Al^{3+} (Kawahara y. col., 2011), los resultados obtenidos a través de las 3 estrategias presentadas sugieren que el complejo Enzima- Al^{3+} formado durante la primera incubación no se disocia durante los 5 min en los que las condiciones del sistema cambian. Es decir que, si bien la unión del Al^{3+} a las bombas es un proceso reversible, este es tan lento que podemos considerar que el proceso es irreversible si tomamos en cuenta un tiempo corto (5 min en SERCA o 35 min en PMCA)

Si uno espera el tiempo suficiente, y si la concentración de inhibidor es mayor a la concentración de enzima, los inhibidores irreversibles producen la inactivación total de una enzima a la que se unen. Entonces, si el Al^{3+} se comporta como si fuera un inhibidor irreversible en el tiempo en el que realizamos los experimentos ¿por qué la actividad Ca^{2+} -ATPasa no tiende a cero como predicen los modelos cinéticos de inhibidores irreversibles? Una hipótesis que explique este resultado es que en el sistema el Al^{3+} participe de otra unión lentamente reversible (irreversible en el tiempo del experimento).

Jones y col., (1997) estudiaron la interacción del Al^{3+} con bicapas lipídicas de diferentes características. Ellos demuestran que el Al^{3+} se une a los fosfolípidos neutros (como DMPC) y esa unión es estable durante 1 hora, aún en presencia de 50 μM malato (un conocido quelante de Al^{3+}). Por lo tanto, es probable que parte del Al^{3+} se una a los fosfolípidos en los que están reconstituidas las bombas y que la disociación del(los) complejos Fosfolípido- Al^{3+} , a pesar de ser reversible, también ocurra en un tiempo superior al del experimento. De esta forma, el Al^{3+} participaría de otra reacción irreversible en los términos de este diseño experimental, por lo que la actividad de las bombas no debe “necesariamente” tender a “cero”, aunque el Al^{3+} se comporte como un inhibidor irreversible.

4.4. En presencia de ATP, el Al^{3+} se disocia de la SERCA pero no en la PMCA.

Si bien nuestros resultados muestran que el Al^{3+} no puede unirse a la PMCA y la SERCA si éstas se encuentran en estado estacionario, ello no significa que éste no pueda disociarse de las enzimas en ese estado. Si este fuera el caso, la actividad Ca^{2+} -ATPasa no estaría representando lo que sucede en el estado previo (preincubación) sino que sería la suma de lo que sucede en éste y del estado estacionario posterior (luego del agregado de ATP). Para evaluar esta hipótesis realizamos una serie de experimentos.

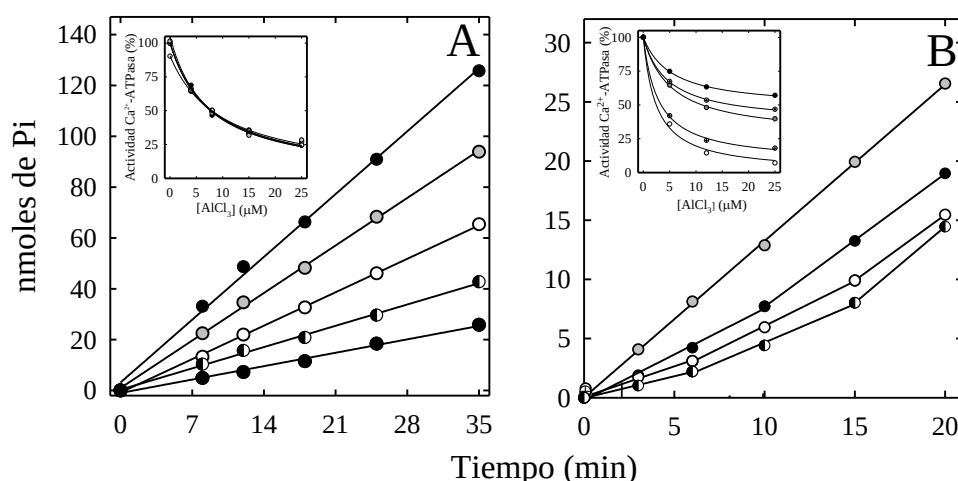


Figura 4.9: nmoles de Pi liberados en función del tiempo por: **(A)** la PMCA luego de su preincubación (8 min) con 0; 4; 8; 15 o 25 μM AlCl_3 o **(B)** la SERCA luego de su preincubación (8 min) con 0; 5; 12 o 25 μM AlCl_3 . *Inset*, Actividad Ca^{2+} -ATPasa en función de la $[\text{AlCl}_3]$ determinada como la liberación de Pi durante 8; 12; 18; 25 o 35 min en la PMCA (A) y 3; 6; 10; 15 o 20 min en la SERCA (B). La figura es representativa

La actividad Ca^{2+} -ATPasa en los experimentos mostrados arriba fue determinada como la aparición de Pi (a partir del ATP) en un periodo de tiempo, 30 min en la PMCA y 5 min en la SERCA. Durante esos tiempos, la aparición de Pi es lineal con el tiempo porque ambas enzimas se encuentran en velocidad inicial. Cuando se agrega AlCl_3 al sistema, la enzima continua en velocidad inicial pero la linealidad puede perderse si el inhibidor se disocia de la enzima y ésta recupera su actividad.

La Fig. 4.9 muestra la actividad de la PMCA (A) y de la SERCA (B) en función del tiempo cuando éstas fueron preincubadas con distintas concentraciones de AlCl_3 durante 8 min. La actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA es lineal durante el periodo de tiempo evaluado (35 min), lo que muestra que durante ese tiempo el Al^{3+} no se disocia de la bomba. En consecuencia, la actividad de la bomba en función de la concentración de

AlCl_3 fue descripta por la ecuación 4.2 y la K_{AI} obtenida fue independiente del tiempo durante el que se determinó dicha actividad (Fig. 4.9A, *inset*).

A diferencia de la PMCA, la actividad de la SERCA sólo es lineal durante los primeros 12 min, luego de este tiempo la actividad de la enzima aumenta, lo que sugiere que el complejo Enzima- Al^{3+} se disocia y la enzima libre recupera su actividad.

La Fig. 4.9B (*inset*) muestra la actividad de la bomba en función de la concentración de AlCl_3 , pero en este caso, los datos experimentales sólo son descriptos por la Ec. 4.2 cuando la actividad Ca^{2+} -ATPasa es determinada durante menos de 12 min. Para tiempos superiores a éste, existe una actividad remanente cuando la concentración de AlCl_3 tiende a infinito. En consecuencia, los datos experimentales fueron mejor descriptos por la ecuación 4.5, que a diferencia de la ecuación 4.2 considera un valor de actividad Ca^{2+} -ATPasa distinto de “cero” cuando la concentración de AlCl_3 tiende a infinito (v_∞)

$$v = v_\infty + \frac{(V_0 - v_\infty) \cdot K_{AI}}{K_{AI} + [AI]} \quad \text{Ec. 4.5}$$

Estos resultados sugieren que el complejo Enzima- Al^{3+} es más estable en la PMCA que en la SERCA cuando se alcanza el estado estacionario. Por otro lado, la actividad Ca^{2+} -ATPasa, representa un promedio de la liberación de Pi en función del tiempo durante 30 min en la PMCA y 5 min en la SERCA, y puede ser utilizada para “revelar” lo que sucede en ausencia de ATP (preincubación) ya que durante esos tiempos el complejo Enzima- Al^{3+} no se disociaría de manera significativa.

Por otra parte, estos resultados confirman que el Al^{3+} se une a estas bombas de manera reversible, ya que cuando el complejo Enzima- Al^{3+} en SERCA se disocia, la enzima vuelve a ser activa.

CAPÍTULO V

En el capítulo anterior vimos que el AlCl_3 inhibe a la PMCA y a la SERCA de manera reversible. Esta inhibición se produce en ausencia de ATP, es decir, cuando las bombas se encuentran en estado de equilibrio. Cuando éstas comienzan a ciclar, el complejo Enzima- Al^{3+} no se forma, al menos en cantidades apreciables. Sin embargo, este complejo puede disociarse y, en la SERCA, se observa que la actividad aumenta luego de determinado tiempo. En la PMCA, este proceso de disociación en estado estacionario, es mucho más lento y, si ocurre, lo haría a tiempos superiores a los evaluados en este trabajo.

Por otra parte, si bien en soluciones acuosas de pH neutro, el AlCl_3 se encuentra formando complejos con hidróxidos ($\text{Al}(\text{OH})_n$) y no como Aluminio libre (Al^{3+}), nuestros resultados sugieren que ésta sería la forma que produce la inhibición.

En este Capítulo presentamos una serie de experimentos cuyo objetivo fue investigar el mecanismo mediante el cual el Al^{3+} inhibe a la PMCA y a la SERCA. Como estrategia general, en estos casos se fijaron las condiciones de preincubación de tal forma que siempre se alcance el equilibrio correspondiente y se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa durante un periodo de tiempo en el que el complejo Enzima- Al^{3+} no se disocia.

5.1. El Al^{3+} se uniría al sitio de unión a Ca^{2+} en la SERCA pero no en la PMCA

Uno de los mecanismos propuestos para la inhibición de proteínas por Al^{3+} , se relaciona con que este ión interacciona con los sitios de unión a Mg^{2+} y Ca^{2+} en diversas proteínas (Martin, 1986a). Debido a su pequeño radio iónico, el Al^{3+} tiene una alta relación carga-masa, lo que produce que su disociación de estos sitios sea muy lenta (Martin, 1986b). Considerando que la PMCA y la SERCA transportan Ca^{2+} y utilizan Mg^{2+} como cofactor enzimático, estudiamos el efecto del AlCl_3 sobre las afinidades aparentes de estos iones.

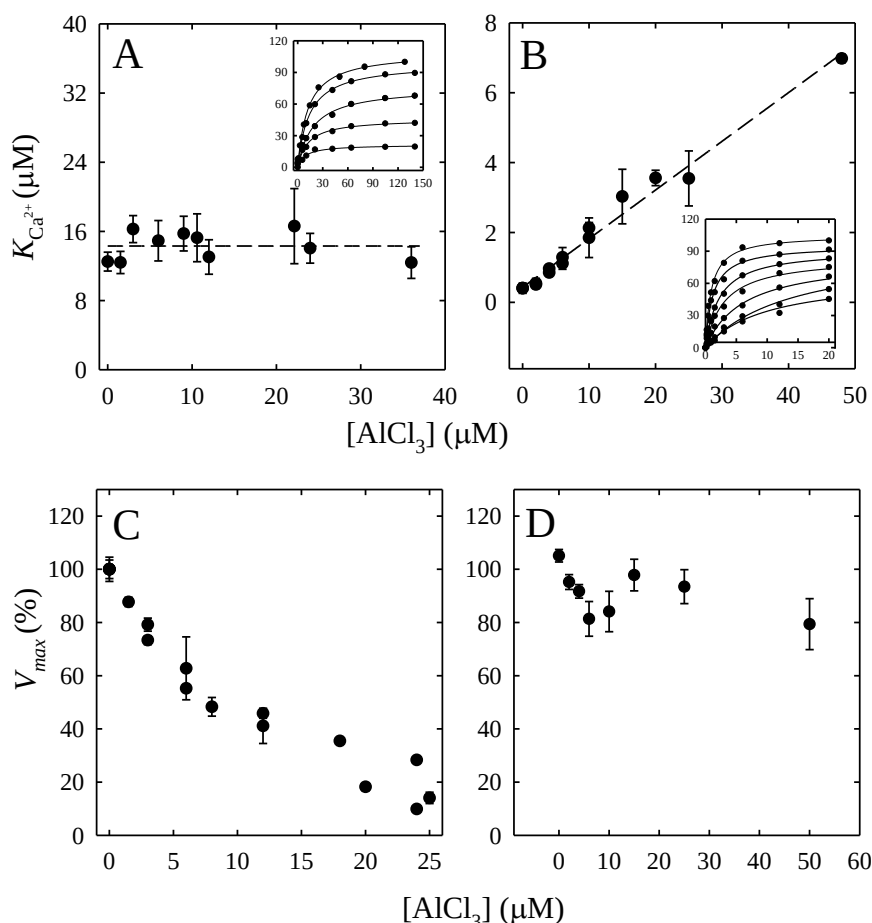


Figura 5.1: Constante de afinidad aparente por Ca^{2+} (K_{Ca}) y velocidad máxima (V_{max}) de la PMCA (A y C) y de la SERCA (B y D) en función de la $[AlCl_3]$. Los valores de K_{Ca} y V_{max} fueron obtenidos a partir del ajuste de la Ec. 4.1 a los valores de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en función de la $[Ca^{2+}]$ en presencia de distintas $[AlCl_3]$ (*inset* en A y B). Se omiten los títulos de los ejes para simplificar la presentación de la información. (*inset* en A y B) experimento representativo de 3 experimentos independientes. A-D promedio $\pm$ ES de 3 experimentos independientes.

La Fig. 5.1 muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA (A, *inset*) y de la SERCA (B, *inset*) en función de la concentración de Ca^{2+} libre ($[Ca^{2+}]$) y en presencia de distintas concentraciones de $AlCl_3$. En esta estrategia experimental, cada enzima fue preincubada durante 10 min en 490 μl de una solución que contenía todos los reactivos necesarios en condiciones óptimas y distintas concentraciones de $AlCl_3$ y de Ca^{2+} . La reacción de actividad se inició por el agregado de 10 μl de ATP 100 mM (2 mM final) y se dejó transcurrir durante 30 min en la PMCA y 5 min en la SERCA.

Tanto en ausencia como en presencia de $AlCl_3$, se observa que la actividad Ca^{2+} -ATPasa de ambas enzimas aumenta en función del $[Ca^{2+}]$. La línea llena representa el ajuste de la ecuación 4.1 a los datos experimentales. La Fig. 5.1A-D muestra los valores de K_{Ca} y V_{max} obtenidos en función de la concentración de $AlCl_3$ para la PMCA y la SERCA, respectivamente.

En la PMCA, la constante de afinidad aparente por Ca^{2+} no se modifica y la velocidad máxima de la enzima disminuye al aumentar la concentración de $AlCl_3$. Al contrario a lo que sucede con la PMCA, la presencia de concentraciones crecientes de $AlCl_3$, producen un aumento de K_{Ca} mientras que la velocidad máxima de la enzima no se modifica significativamente. Si bien el mecanismo de inhibición competitiva está definido para inhibidores reversibles, y en nuestra estrategia experimental el Al^{3+} se comporta como un inhibidor irreversible, el efecto protector que muestra el Ca^{2+} sobre la inhibición por Al^{3+} , sugiere que éste

5.2. La afinidad aparente por Mg^{2+} de la PMCA y la SERCA no se modifica por la presencia de Al^{3+}

Al igual que en el resto de las P-ATPasas, el Mg^{2+} es un cofactor esencial para que estas enzimas puedan transportar Ca^{2+} . El Mg^{2+} interviene en varios pasos del ciclo de reacción de estas bombas. Además de ser necesario formando un complejo con ATP -el sustrato de estas enzimas es el complejo Mg^{2+} -ATP-, estas enzimas poseen un sitio de unión a Mg^{2+} . Es por ello, que cuando todo el ATP se encuentra como ATP- Mg^{2+} , Mg^{2+} libre hace referencia al catión que se encuentra en solución, puede unirse a la enzima y producir un aumento de su velocidad (tal como muestran las Fig. 4.1B. Por simplicidad, nos referiremos al Mg^{2+} libre como Mg^{2+} y al Mg^{2+} total como Mg^{2+}_T .

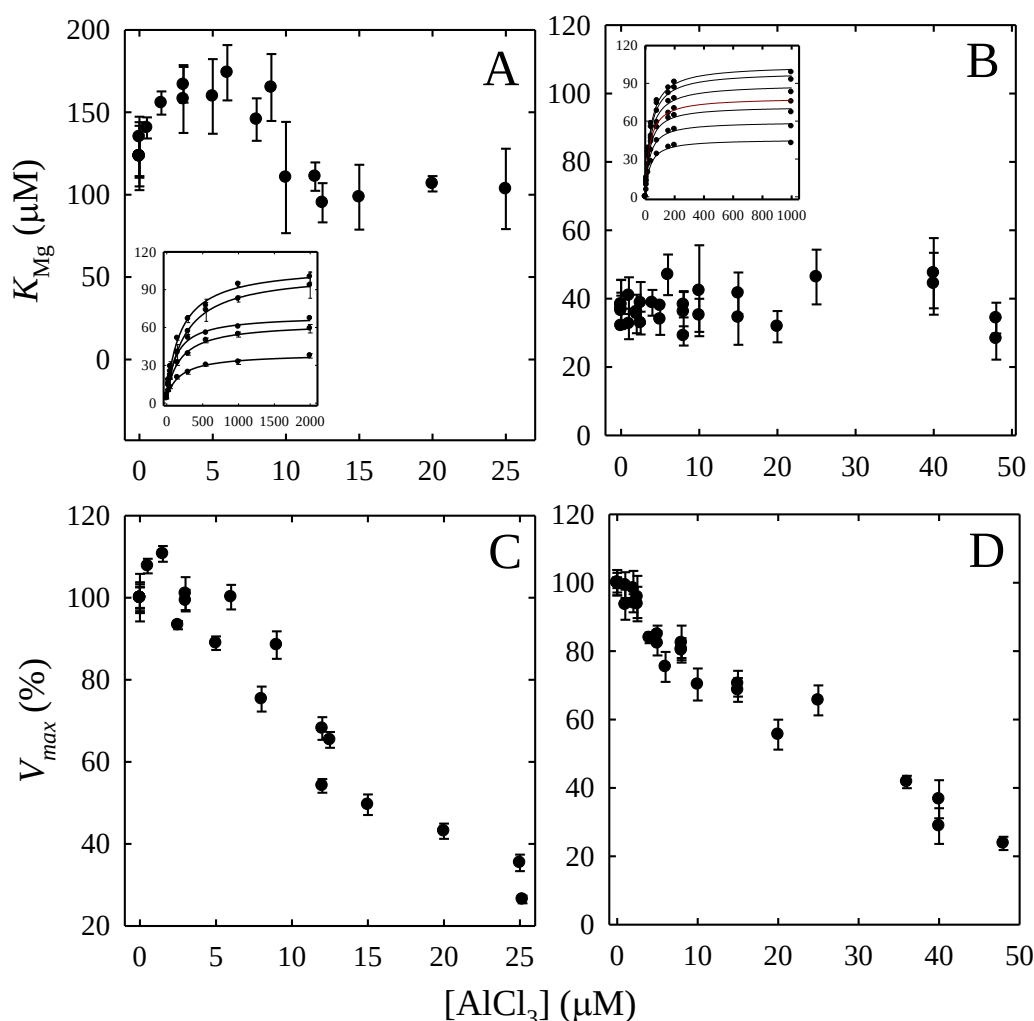


Figura 5.2. Constante de afinidad aparente por Mg^{2+} (K_{Mg}) y velocidad máxima (V_{max}) de la PMCA (A y C) y de la SERCA (B y D) en función de la $[AlCl_3]$. Los valores de K_{Mg} y V_{max} fueron obtenidos a partir del ajuste de la Ec. 4.1 a los valores de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en función de la $[Mg^{2+}]$ en presencia de distintas $[AlCl_3]$ (*inset* en A y B). Se omiten los títulos de los ejes para simplificar la presentación de la información. (*inset* en A y B) experimento representativo de 3 experimentos independientes. A-D

Para determinar el efecto de distintas concentraciones de $AlCl_3$ sobre la afinidad aparente de las enzimas por Mg^{2+} , utilizamos una estrategia experimental similar a la del caso anterior pero con la siguiente salvedad: como en la situación de equilibrio no hay ATP, la concentración de Mg^{2+}_T es igual a la concentración de Mg^{2+} por lo tanto, junto con el ATP se adicionó la cantidad de Mg^{2+} necesaria para que todo el nucleótido esté como ATP- Mg^{2+} , y los resultados en estado estacionario no se vean afectados por la falta de este sustrato.

La Fig. 5.2 muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA (A, *inset*) y de la SERCA (B, *inset*) en función de la concentración de Mg^{2+} y en presencia de distintas concentraciones de AlCl_3 . La línea llena representa el ajuste de la ecuación 4.1 a los datos experimentales. Los valores de K_{Mg} y V_{max} obtenidos en presencia de distintas concentraciones de AlCl_3 se muestran en las Fig. 5.2A-D

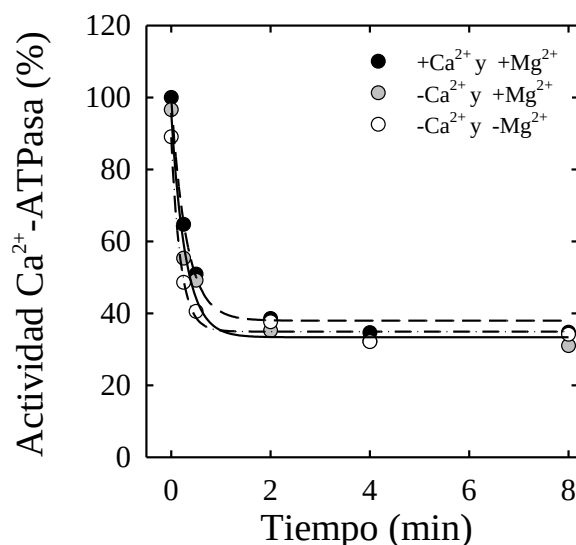


Figura 5.3: Actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) de la PMCA en función del tiempo de preincubación con una solución 12 μM AlCl_3 . La preincubación fue realizada en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} óptimos (+ Ca^{2+} y + Mg^{2+}); sólo de Mg^{2+} (- Ca^{2+} y + Mg^{2+}) o en ausencia de ambos iones (- Ca^{2+} y - Mg^{2+}). En todos los casos, la línea llena representa el ajuste de la Ec. 4.3 a los datos experimentales. Experimento representativo de 2 experimentos independientes.

En ambas enzimas, la presencia AlCl_3 produjo una disminución de la V_{max} sin cambios significativos en las K_{Mg} . Este resultado sugiere que el Al^{3+} no se uniría al sitio de unión del Mg^{2+} .

Con la estrategia experimental utilizada en estos experimentos, los resultados sugieren que el mecanismo de inhibición de la PMCA por Al^{3+} no involucra la unión del Al^{3+} a los sitios de unión a Ca^{2+} o Mg^{2+} de la enzima, como si sucedería en la SERCA. Para corroborar este resultado, decidimos utilizar otra estrategia experimental.

En este caso, se preincubó durante distintos tiempos a la PMCA con 12 μM AlCl_3 y: (1) presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} óptimos (control); (2) presencia de Mg^{2+} óptimo y ausencia de Ca^{2+} o (3) ausencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Luego del tiempo de preincubación correspondiente, la reacción se inició por el agregado de ATP, CaCl_2 y MgCl_2 de tal forma que en todos los casos las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} en estado estacionario sean las óptimas. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 5.3. La línea llena representa el ajuste de la Ec. 4.3 a los datos experimentales. Los datos experimentales no fueron significativamente diferentes para los tres tratamientos empleados. Este resultado muestra que la presencia de Ca^{2+} y/o Mg^{2+} en el medio de preincubación, no afecta apreciablemente la inhibición de la PMCA por AlCl_3 .

5.3. El pH no afecta la inhibición por AlCl_3

Aunque con diferente estequiometría, tanto la SERCA como la PMCA transportan Ca^{2+} y cotransportan protones. Por lo tanto, el pH podría afectar la inhibición por AlCl_3 , no sólo por un efecto sobre el equilibrio de las especies que forma este ion, sino también por un efecto sobre la concentración del ion cotrasportado por estas bombas. Para estudiar el efecto del pH sobre la inhibición por AlCl_3 , las enzimas fueron preincubadas en condiciones óptimas pero a pH 6.5; 7 ó 7.8 y en presencia de diferentes de diferentes AlCl_3 . En el caso de la SERCA, el *buffer* de pH 7.8 fue reemplazado por otro de pH 7.5 debido a que ésta es rápidamente inhibida por pH alcalino (Fig. 4.7).

A diferencia de la estrategia experimental utilizada anteriormente (Fig. 4.7), en este caso, la formación del complejo Enzima- Al^{3+} ocurre al pH evaluado. De esta forma, al acidificar el medio aumenta la cantidad de Al^{3+} y uno esperaría que ello produzca un aumento de la constante de afinidad aparente (K_{AI}) cuando la actividad Ca^{2+} -ATPasa es expresada en función de la concentración de AlCl_3 .

La Fig. 5.4 muestra los resultados obtenidos para la PMCA (A) y la SERCA (B). En todos los casos, los datos experimentales fueron descriptos por la ecuación 4.2. Los valores de K_{AI} obtenidos en cada caso se muestran en la Tabla 5.1. En coincidencia con los resultados mostrados en el Capítulo anterior (Fig 4.7), el valor del parámetro V_0 (que corresponde a la actividad Ca^{2+} -ATPasa máxima obtenida en ausencia de AlCl_3) varía de acuerdo al pH de manera particular para cada ATPasa. Sin embargo, los valores de K_{AI} obtenidos fueron similares independientemente del pH del medio (Tabla 5.1).

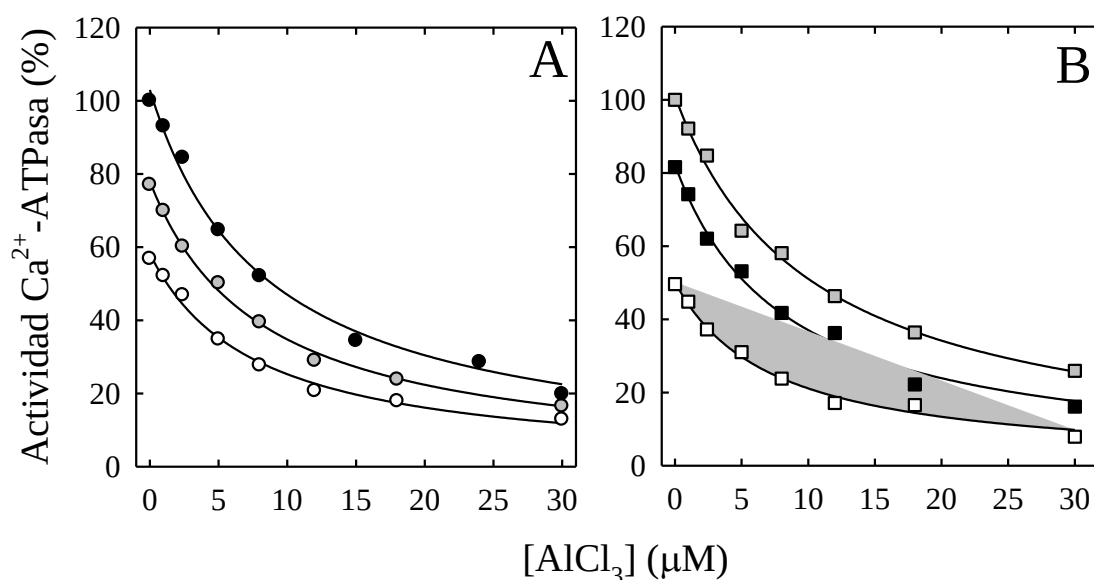


Figura 5.4. (A) Actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) de la PMCA en función de la $[\text{AlCl}_3]$ a pH 6.5 (círculos grises); 7.2 (círculos negros) y 7.8 (círculos blancos). **(B)** Actividad Ca^{2+} -ATPasa (%) de la SERCA en función de la $[\text{AlCl}_3]$ a pH 6.5 (cuadrados grises); 7.2 (cuadrados negros) y 7.5 (cuadrados blancos). La actividad máxima obtenida para cada enzima fue tomada como 100%. En todos los casos, la línea llena representa el ajuste de la Eq. 4.2 a los datos experimentales. Experimento representativo de 3

Tabla 5.1. En coincidencia con los resultados mostrados en el Capítulo anterior (Fig 4.7), el valor del parámetro V_0 (que corresponde a la actividad Ca^{2+} -ATPasa máxima obtenida en ausencia de AlCl_3) varía de acuerdo al pH de manera particular para cada ATPasa. Sin embargo, los valores de K_{AI} obtenidos fueron similares independientemente del pH del medio (Tabla 5.1).

pH	K_{AI} (μM)	
	PMCA	SERCA
6,5	$8,3 \pm 0,6$	$10,2 \pm 0,5$
7,2	$8,1 \pm 0,4$	$8,2 \pm 0,6$
7,5	-	$7,3 \pm 0,6$
7,8	$7,7 \pm 0,5$	-

El hecho de que la concentración de Al^{3+} aumente a pH ácido se relaciona con el cambio en las interacciones que ocurren en las moléculas que actúan como quelantes de esta forma libre. Es posible que a pH ácido, la afinidad de la enzima por Al^{3+} sea diferente, dado que los residuos que potencialmente lo coordinarían (aspartato y glutamato) pueden encontrarse protonados. Es decir que, si bien a pH ácido hay más Al^{3+} en el medio la capacidad de la enzima de unir este ión podría ser menor. Por otro lado, también es posible que moléculas presentes en el sistema (como los lípidos) puedan unirse al Al^{3+} de manera irreversible y por lo tanto, el pH no tenga un efecto sobre la concentración de Al^{3+} en solución.

En conclusión, consideramos que este experimento no descarta que la forma que inhibe a la PMCA y la SERCA es el Al^{3+} , ya que como las interacciones entre la enzima y este ión cambian en cada estado del sistema evaluado, las K_{AI} obtenidas no son directamente comparables. Este punto se retomará más adelante.

5.4. La unión del Al^{3+} estabiliza el intermediario fosforilado (EP) en la PMCA pero no en la SERCA

Los resultados mostrados en los apartados anteriores, se obtuvieron a partir de una medida del ciclo de reacción completo de estas enzimas. Estudiar las reacciones parciales, o los efectos sobre intermediarios de ese ciclo, brindaría información adicional.

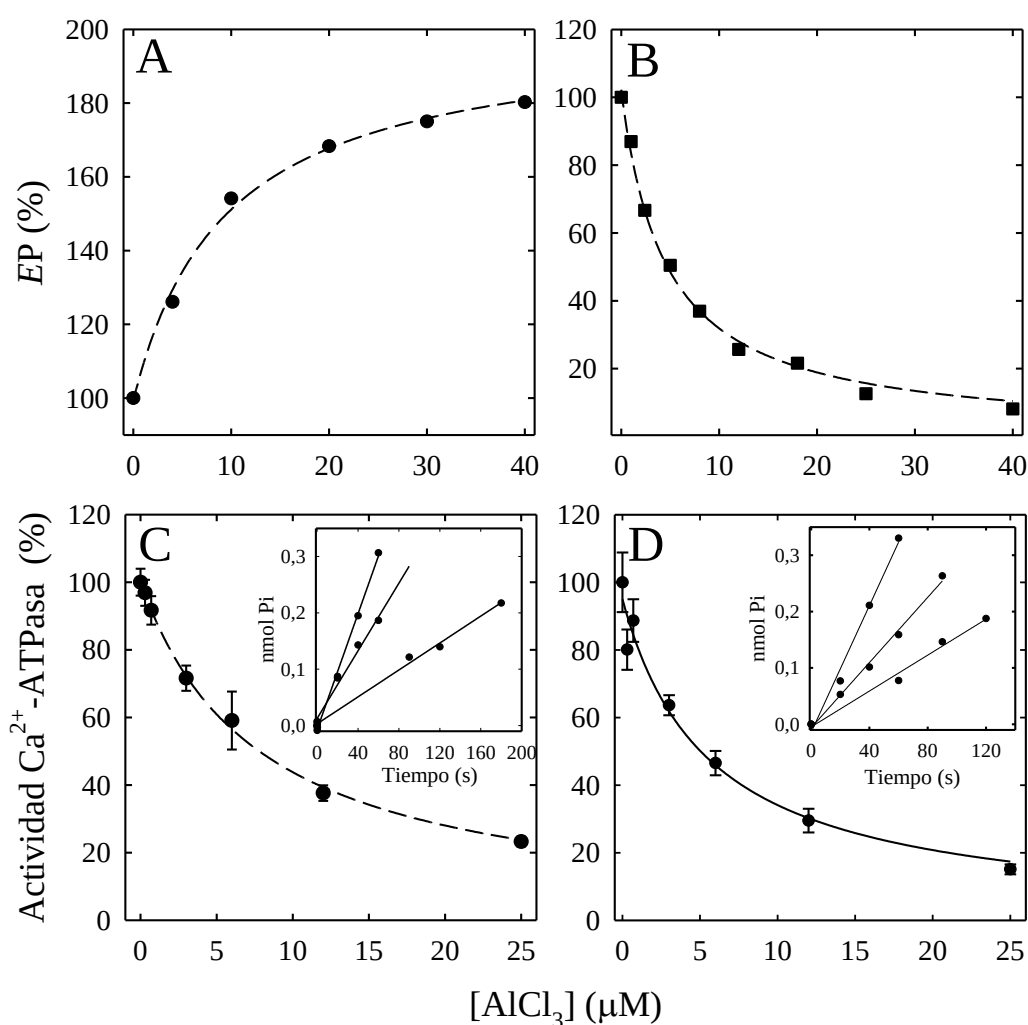


Figura 5.4: Nivel del intermediario fosforilado (EP) en la PMCA (A) y en la SERCA (B) en función de la concentración de AlCl_3 . La línea llena representa el ajuste de la Ec. 5.1 (en A) o 5.2 (en B) a los datos experimentales. Actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA (C) y de la SERCA (D) en presencia de 25 μM ATP y en función de la $[\text{AlCl}_3]$. La línea llena en ambos paneles representa el ajuste de la Ec. 4.2 a los datos experimentales. Inset, nmol de Pi liberado en función del tiempo. Experimento representativo de 2 experimentos independientes

Durante el ciclo de reacción que permite el transporte de iones, las P-ATPasas forman un intermediario ácido estable (EP). Este intermediario es uno de los más estudiados en este tipo de bombas por la gran cantidad de información que brinda su análisis. Por lo tanto, nuestro siguiente paso para caracterizar el mecanismo de inhibición del Aluminio en la PMCA y en la SERCA, fue estudiar el efecto del $AlCl_3$ sobre la formación de EP .

En este caso, la estrategia experimental fue la misma que la utilizada en los experimentos descriptos en este Capítulo. La Fig. 5.5 muestra como varía EP en la PMCA (A) y en la SERCA (B) en función de la concentración de $AlCl_3$.

En la PMCA, EP aumenta en función de la concentración de $AlCl_3$. La línea llena muestra el ajuste de la Ec. 5.1 a los datos experimentales.

$$EP = EP_0 + \frac{(EP_{max} - EP_0) \cdot [Al]}{K_{Al} + [Al]}$$

En esta ecuación, EP_0 representa la cantidad de intermediario en ausencia de $AlCl_3$, EP_{max} es la cantidad de intermediario formado cuando a la concentración $AlCl_3$ ($[Al]$) tiende a infinito y K_{Al} es la concentración $AlCl_3$ a la que se obtiene el 50% del efecto máximo sobre este intermediario. El valor de EP_0 corresponde al nivel de EP en estado estacionario y fue considerado como 100%. Los valores de K_{Al} y EP_{max} obtenidos fueron $9,4 \pm 1,5 \mu M$ y $198,8 \pm 4,7 \%$, respectivamente. Estos resultados muestran que el Al^{3+} inhibe a la PMCA porque impide la defosforilación de la bomba.

En la SERCA, la línea llena en la Fig. 5.5B representa el ajuste de la Ecuación 5.2 a los datos experimentales.

$$EP = \frac{EP_0 \cdot K_{Al}}{K_{Al} + [Al]}$$

En ella, EP_0 es la cantidad de EP en ausencia de $AlCl_3$ y K_{Al} es la concentración $AlCl_3$ a la que se obtiene el 50% del nivel de este intermediario. Igual que en la PMCA, EP en estado estacionario (ausencia de $AlCl_3$) fue tomado como 100%. El valor de K_{Al} obtenido fue: $4,5 \pm 0,3 \mu M$.

A diferencia de lo que ocurre en la PMCA, en la SERCA el Al^{3+} impide la fosforilación de la enzima. El hecho de que los valores de K_{Al} obtenidos para ambas bombas no resulten significativamente diferentes de los obtenidos a partir de la cuantificación de la hidrólisis de ATP (Fig. 4.2) sugiere que éste es el paso de ciclo de reacción involucrado en el mecanismo de inhibición por aluminio. Por otra parte, este resultado también indicaría que en el caso de la PMCA, el complejo Enzima- Al^{3+} puede unir ATP y fosforilarse, lo que sugiere que dicho complejo tiene las características necesarias para ingresar al ciclo de reacción. En la SERCA, sucedería algo diferente ya que la bomba no se fosforila. Esto podría ocurrir porque el ATP no puede unirse al complejo Enzima- Al^{3+} o, si se uniera, el complejo Enzima- Al -ATP no tendría la conformación apropiada para que ocurra la fosforilación de la bomba. Lo claro es que, a pesar de la similitud que existe entre ambas bombas, el aluminio las inhibe por mecanismos diferentes.

5.5. La inhibición de la PMCA y la SERCA no involucra al complejo ATP- Al^{3+}

Debido a la baja constante de disociación del complejo ATP- Al^{3+} (Tu y col., 2016), el Al^{3+} desplaza al Mg^{2+} en el complejo ATP- Mg^{2+} . Por lo tanto, el hecho de que la actividad Ca^{2+} -ATPasa fuera determinada en presencia de 2 mM ATP- Mg^{2+} (Fig. 4.2) y EP en presencia de 25 μM ATP- Mg^{2+} (Fig. 5.5) puede significar una diferencia experimental importante. En otras palabras, si el Al^{3+} se uniera al ATP desplazando el Mg^{2+} , en la medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa tendríamos igual un exceso de ATP- Mg^{2+} (≈ 2 mM) mientras que en la determinación de EP una gran parte de ATP disponible estaría complejoado con Al^{3+} .

Para evaluar esta hipótesis determinamos la actividad Ca^{2+} -ATPasa en las mismas condiciones en la que fue determinado el nivel de EP. La Fig.5.5 C y D muestran los resultados obtenidos en la PMCA y en la SERCA, respectivamente. Para ambas bombas, el efecto del AlCl_3 sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa determinada en presencia de 25 μM ATP fue similar al obtenido en presencia de 2 mM ATP. Las curvas fueron bien descritas por la Ec. 4.2 y las K_{AI} obtenidas ($7,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ para la PMCA y $5,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$ para la SERCA) no fueron significativamente diferentes de las determinadas en presencia de 2 mM ATP. Además, la cantidad de Pi liberado fue lineal en el tiempo de medida (*inset*) lo que descarta la posibilidad de que la disminución de EP en SERCA se deba a que se agotó el sustrato para la fosforilación (ATP-Mg^{2+}).

Si bien estos resultados no descartan que pueda formarse ATP-Al^{3+} , muestran que la inhibición de estas P-ATPasas no es debida a ese mecanismo. Este resultado coincide con lo descrito en el Capítulo anterior, donde se demuestra que una vez que estas bombas comienzan a ciclar por el agregado de ATP, no son inhibidas por AlCl_3 .

CAPÍTULO VI

EL MODELO DE LA INHIBICIÓN POR ALUMINIO EN LAS BOMBAS DE CALCIO

Los resultados experimentales mostrados en los capítulos anteriores muestran que el mecanismo por el cual el Aluminio inhibiría a la PMCA y la SERCA es diferente. Sobre la base de esta información, en este Capítulo propondremos un modelo que explica el comportamiento de ambas enzimas frente al AlCl_3 .

6.1 Identidad del inhibidor involucrado

Hemos mencionado que en solución acuosa el Aluminio sufre una serie de reacciones de hidrólisis progresivas generando una serie de complejos con distinto número de aniones OH^- . La distribución de estas especies dependen del pH del medio, así a pH 7 la especie $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ es la predominante y la concentración de Al^{3+} se encuentra en trazas. A pesar de su baja concentración, nuestros resultados presentan varias evidencias para suponer que el Al^{3+} es la especie que se une a la PMCA y a la SERCA para formar un complejo inhibido (Enzima-Al^{3+})

Las estructuras de la enzima D-Xilosa isomerasa (Gérczei y col., 1999) y la de la ovotransferrina (Mizutani y col., 2005) formando complejos con aluminio muestran que este se encuentra en su forma Al^{3+} . Por otro lado, fue descrito en la mayoría de los casos, que el Aluminio se une a proteínas a través de los sitios que normalmente quelan cationes di y trivalentes (Ganrot P., 2005). Esta unión solo podría producirse si el aluminio se encuentra con carga positiva como en el caso de las especies Al^{3+} y $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$. Nuestros resultados presentan varias evidencias a favor de esta hipótesis. En primer lugar como se mostró en el Capítulo 4, la inhibición que alcanza la enzima es mayor si el aluminio antes se encontraba en una solución ácida (siendo este efecto más notorio en SERCA). Esto quiere decir que la especie inhibidora es mayoritaria a pH más ácido. Si bien cuando se mezcla el aluminio con la solución en la que se encuentra la enzima, el buffer de esta última hace que la solución de reacción permanezca a pH 7.4, hasta que se alcanza el equilibrio de pH, las enzimas estuvieron en contacto con concentraciones mayores de Al^{3+} (por un corto tiempo), si el AlCl_3 estaba preparado en una solución de pH más ácido. En las soluciones con aluminio más alcalinas (desde pH 6 en adelante) la cantidad de Al^{3+} comienza a disminuir en pos de otras especies formando complejos con hidróxidos y por lo tanto la enzima tiene menor probabilidad de entrar en contacto con un átomo de Aluminio en su forma Al^{3+} . Esto coincide con una menor inhibición de las enzimas, como se ve experimentalmente, cuando el Aluminio de preparó a pH alcalino.

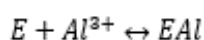


Figura 6.1: Equilibrio de la inhibición de la enzima por Aluminio.

El complejo *EAI* es muy estable como refleja el hecho de que la actividad es constante hasta por lo menos 5 min en el caso de SERCA y hasta los 35 minutos en el caso de PMCA (Fig.4.9), momento a partir del cual se comienza a detectar que las enzimas recuperan su actividad. Cabe destacar que la reversión se pone de manifiesto dado que como se mostró en el apartado 4.3.b), el Aluminio no es capaz de inhibir las enzimas (es decir formar el complejo *EAI*) cuando éstas se encuentran ciclando. En la estrategia utilizada en esos experimentos, las enzimas fueron preincubadas con Aluminio, de manera que se formó *EAI* como muestra la Fig. 6.1 Luego se agregó ATP, que impide que la formación de nuevos complejos *EAI* y por lo tanto solo es posible el paso inverso como muestra la Fig. 6.2. De esta manera globalmente lo que se ve es que la preparación en el tubo de reacción recupera actividad (es decir los complejos *EAI* formados previamente comienzan a desaparecer y no se forman nuevos por efecto del ATP).

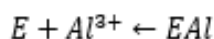


Figura 6.2: Ecuación que muestra el proceso simplificado de reversión cuando las bombas comienzan a realizar su ciclo catalítico.

Como resultado, si esperamos un tiempo suficientemente largo, todas las especies *EAI* volverían a convertirse en la enzima activa (*E*) si esta se encuentra ciclando. Estos resultados muestran entonces que el proceso de reversión es relativamente lento. Esto coincide también con los resultados mostrados en el apartado 4.3.c) donde una disminución de la $[Al^{3+}]$ producida tanto por un cambio en el pH, una dilución o por el agregado de un quelante al medio, no logran que se disocie el complejo *EAI* formado en pocos minutos.

Dado tenemos una idea de la velocidad de disociación del complejo *EAI* (que como dijimos es muy lenta) es posible estimar la constante de equilibrio de la reacción de formación del complejo. Las velocidades de asociación y disociación del complejo enzima-aluminio se relacionan con la constante de equilibrio que se muestra en la Fig. 6.3.

$$K_{eq} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Figura 6.3: Relación entre las constantes que rigen el proceso de unión de la enzima al Aluminio

k_1 es el valor de la velocidad de asociación entre la enzima y el Al^{3+} , dado que se trata de moléculas pequeñas, esta velocidad debe ser cercana a la velocidad de difusión de moléculas en medio acuoso que es aproximadamente: $10^9 M^{-1} s^{-1}$. k_{-1} es la velocidad de reversión del proceso, esta constante es de orden 0 y sus valores deben ser menores a $10^{-3} s^{-1}$ para explicar la lenta recuperación de la actividad en SERCA. La ecuación en 6.3 permite postular que, dado que la velocidad de asociación es rápida y la de reversión es lenta, K_{eq} debe ser pequeña (menor a 10 pM según los valores mencionados para SERCA). En el caso de PMCA dado que la velocidad de reversión (constante k_{-1}) es aún más lenta que SERCA, su constante de afinidad debe ser mucho menor que 10 pM.

La constante de disociación (K_D) de complejo *EAI* formado según el modelo propuesto en la Ec. 6.1 se muestra en la Fig. 6.3. En el equilibrio, K_{eq} es igual a K_D y, considerando que la formación de *EAI* ocurre en un único paso, K_D es una medida de la afinidad de la enzima por el Al^{3+} .

$$K_D = \frac{[E][Al^{3+}]}{[EAI]}$$

Figura 6.4: Constante de disociación del complejo *EAI* formado según el modelo presentado

Por lo tanto, el valor de K_D también es pequeño y consecuentemente, la afinidad de la enzima por Al^{3+} es alta. Si la especie inhibitoria fuese $Al(OH)_4^-$, dado que a pH 7.2 la mayoría del $AlCl_3$ se encuentra en esa forma, con esa constante de afinidad prácticamente toda la enzima debería estar inhibida en todas las concentraciones ensayadas. De esta manera, solo las especies en baja concentración (es decir Al^{3+} o $Al(OH)^{2+}$) son las que podrían estar formando un complejo con la enzima. Esta hipótesis considera que todos los equilibrios en los que participa el Al^{3+} son reversibles (excepto la formación del complejo Enzima- Al^{3+}). Si el Al^{3+} forma otros complejos irreversibles en el sistema, no existiría en la forma libre. El hecho de que exista una fase rápida sólo cuando el aluminio se prepara a un pH ácido, apoya la hipótesis de que la especie inhibitoria es prevalente a pH bajo.

Considerando que la especie inhibitoria competiría con el Ca^{2+} en la SERCA e impediría la defosforilación en la PMCA (un paso acelerado por la unión de Mg^{2+}) que implica que el inhibidor se unen a sitios con carga negativa en la enzima, y que la especie es más prevalente a pH ácido (inclusive pH menores a 4) consideramos que el Al^{3+} es el ión que inhibiría a estas enzimas.”

Es posible que esta asunción no sea válida si el Al^{3+} se une de manera Considerando que la especie inhibitoria competiría con el Ca^{2+} en la SERCA e impediría la defosforilación en la PMCA (un paso acelerado por la unión de Mg^{2+}), y que la especie es más prevalente a pH ácido (inclusive pH menores a 4) consideramos que el Al^{3+} es el ión que inhibiría a estas enzimas.

6.2 Efecto protector del ATP y el ciclo de reacción.

Como mostramos en el Capítulo 5, tanto SERCA como PMCA presentan ciertas particularidades en la inhibición por Aluminio. A diferencia de lo que ocurre con la hexokinasa (Colowick y Womack, 1979) ambas proteínas no se inhiben si el ATP es agregado al mismo tiempo que Aluminio. El efecto protector del ATP podría deberse a que cuando las enzimas se encuentran en su ausencia, adquieren una conformación a la cual el Al^{3+} puede unirse. En cambio cuando ambas proteínas empiezan a ciclar pasan por varios intermediarios en su ciclo de reacción. En las condiciones en las que determinamos la actividad Ca^{2+} -ATPasa (todos los sustratos en concentraciones saturantes), el paso más lento en el ciclo catalítico en ambas bombas es la defosforilación (Haseelbach, 1978). La Fig. 6.4 muestra un esquema simplificado de este paso.

En presencia de 2 mM ATP y Ca^{2+} saturante, dado que la velocidad del paso $EP \rightarrow E + Pi$ es la más lenta del ciclo, se genera una acumulación de enzimas en el estado EP . Por este motivo, cuando la enzima está ciclando, la mayor parte de ellas ($\approx 90\%$) se encuentran fosforiladas y el sitio de unión a Ca^{2+} de encuentra inaccesible al medio (ocluido). Consecuentemente, este intermediario de la enzima (o su conformación) tiene no sólo baja afinidad por Ca^{2+} sino también por Mg^{2+} , que se encuentra estabilizando el fosfato permitiendo la formación de formando un complejo estable (Picard y col., 2007). Estas diferencias en la afinidad de la enzima por Ca^{2+} y Mg^{2+} también podrían ocurrir con la afinidad de la enzima por Al^{3+} impidiendo la inhibición de las bombas en estado estacionario.

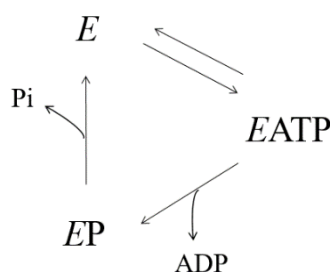


Figura 6.4: Esquema simplificado del ciclo de reacción de SERCA y PMCA. Donde E indica la enzima que está uniéndose a Ca^{2+} , esta puede unir ATP de forma reversible formando $EATP$ y fosforilarse generando EP que libera el Ca^{2+} del otro lado de la membrana. Luego sigue un paso de defosforilación y unión de Ca^{2+} que vuelve a generar E .

6.3 Mecanismo de la inhibición del Aluminio en SERCA.

Nuestros resultados muestran que PMCA y SERCA se inhiben por mecanismos distintos. En el caso de SERCA mostramos que el Ca^{2+} tiene un efecto protector sobre la inhibición por Al^{3+} (apartado 5.1), sugiriendo que el Al^{3+} podría unirse al sitio de unión a Ca^{2+} de la bomba. Esto no ocurriría con el Mg^{2+} , al menos en el rango ensayado. Por otra parte, mostramos en el apartado 5.4 que la unión del Al^{3+} a la SERCA impide la fosforilación de la enzima. La unión del Ca^{2+} a la SERCA produce que el dominio transmembrana adquiera una conformación que se traduce en cambios en los dominios citoplasmáticos (Inesi y col., 2006). Este estado de la enzima se conoce como E_1 , y en presencia de ATP, la enzima puede fosforilarse desencadenando el primer paso de su ciclo de reacción. La unión del Ca^{2+} es esencial y la enzima prácticamente no puede hidrolizar ATP en ausencia de este ión (Inesi y col., 2006). Nuestros resultados muestran que, si bien el Al^{3+} podría unirse a los sitios de Ca^{2+} , esa unión no tendría la capacidad de producir los cambios conformacionales necesarios para que ocurra la fosforilación de la bomba. De esta manera, el mecanismo de inhibición del Al^{3+} en SERCA, se basaría en impedir la unión del Ca^{2+} por ocupación de su sitio en la enzima. El complejo Enzima- Al^{3+} tendría una conformación diferente a la del complejo Enzima- Ca^{2+} , y consecuentemente, la bomba no podría hidrolizar ATP y fosforilarse. Cuando se agrega ATP al sistema, la enzima libre (E) comienza a ciclar mientras que la que se encuentra unida al Al^{3+} ($E\text{Al}$) no lo hace. La actividad Ca^{2+} -ATPasa en este sistema permanece lineal durante un periodo de tiempo pero luego comienza a aumentar, indicando que el complejo $E\text{Al}$ se disocia y la enzima libre es activa. Como mencionamos antes, esto ocurre naturalmente dado que el Al^{3+} no es capaz de inhibir a la enzima cuando está se encuentra ciclando pero sí es capaz de disociarse de la bomba. El resultado es que la lenta separación del Al^{3+} (por su alta afinidad) no es contrarrestada con la formación de nuevo complejo enzima-Aluminio y la SERCA comienza a recuperar actividad con el tiempo.

6.4 Mecanismo de la inhibición del Al^{3+} en la PMCA.

A diferencia de lo que ocurre en la SERCA, la PMCA es capaz de fosforilarse cuando está unida al Al^{3+} (Fig. 5.4A). Por otra parte la inhibición no es competitiva con Ca^{2+} (Fig. 5.1A). Esta evidencia nos lleva postular que el mecanismo inhibición por Al^{3+} en la PMCA es distinto al de la SERCA. El aumento la cantidad de enzima fosforilada (EP) indica dos cosas: (1) que la enzima unida Al^{3+} es capaz de “comenzar o ingresar” a su ciclo catalítico y (2) que el paso de defosforilación no se produce (Fig. 6.6).

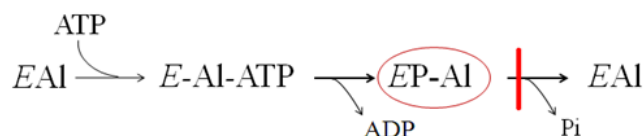


Figura 6.6 Esquema que representa el efecto que tiene el agregado de ATP a la enzima unida a Al^{3+} . Los dos primeros pasos del ciclo de reacción suceden, pero el tercero (cortado por la línea roja), está impedido (o es muy lento) de manera que se

Como muestra el esquema de la Fig.6.6, que el Al^{3+} impida a la proteína defosforilarse, indica que el complejo inhibido $E\text{Al}$ es distinto al complejo que se forma en la SERCA. En el caso de la PMCA, el Al^{3+} no se encontraría en el sitio de unión de Ca^{2+} , sino que, el hecho de que se establezca el intermediario fosforilado sugiere que se une a un sitio cercano al residuo que se fosforila, de manera tal que pueda alterar el proceso de defosforilación de la enzima.

6.5 Efecto del Mg^{2+} en el mecanismo de inhibición por Al^{3+} de la PMCA.

Según presentamos en el apartado 5.2, la inhibición por Al^{3+} no es competitiva con Mg^{2+} . Esto a priori podría parecer contradictorio dado que el Mg^{2+} unido a la enzima acelera en gran medida el proceso de defosforilación de P-ATPasas (Garrahan, 1976). Sin embargo este no es el único caso en que se ve un comportamiento similar. Por ejemplo, la hexoquinasa es inhibida por Al^{3+} cuando éste ocupa el sitio de Mg^{2+} necesario para la

fosforilación de azúcares a partir de ATP. A pH 6.8 no se observa competencia de la inhibición por Al^{3+} con Mg^{2+} , mientras que a pH 7.2 la competencia es parcial y solo se ve a grandes concentraciones de Aluminio (Lai y Blass, 1984). En el caso de la PMCA, sólo hemos estudiado la competencia con Mg^{2+} a pH 7.2. En estas condiciones, se observó un ligero aumento de la K_{Mg} sin cambios apreciables en la V_{max} , a bajas $[\text{AlCl}_3]$ ($\approx 8 \mu\text{M}$). Sin embargo, al aumentar la $[\text{AlCl}_3]$ estos dos parámetros tuvieron un comportamiento compatible con una inhibición no competitiva (Fig. 5.2 A y C).

Una hipótesis para explicar la relación entre el Al^{3+} y la PMCA puede ser que, si bien el sitio de unión del inhibidor debe estar cercano al residuo que se fosforila, la unión de Al^{3+} no impide la unión del Mg^{2+} sino que altera la solvatación de este ion de manera que no pueda ejercer la función catalítica de desfosforilación de la enzima. Por ejemplo la D-xilosa isomerasa posee dos sitios de unión de iones, el primero es ocupado Mg^{2+} todo el tiempo cuando la enzima realiza su ciclo catalítico. El segundo sitio es ocupado por otro átomo de Mg^{2+} en ciertos momentos y su posición cambia durante la reacción de isomeración de azúcares. En presencia de Al^{3+} , éste ocupa el primer sitio del ión catalítico y el Mg^{2+} pasa a ocupar el segundo sitio. La ubicación del Al^{3+} por tener una mayor densidad de carga impide el inicio de la reacción y la enzima se inhibe, aunque tiene la capacidad de unir Mg^{2+} y por lo tanto no se observa una definida competencia a pesar de que el Al^{3+} ocupa un sitio que normalmente es ocupado por Mg^{2+} (Collyer y col., 1990).

En el caso de P-ATPasas, Picard y col. (2007) demostraron recientemente que en la estructura cristalográfica de la SERCA en la conformación E_1 (presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+}) aparece un solo ión Mg^{2+} unido a la enzima pero, en la estructura análoga a la bomba fosforilada ($E_1\text{P}$) aparece un segundo ión coordinando el fosfato. Similar a lo descrito en la D-xilosa isomerasa (Collyer y col., 1990), este segundo Mg^{2+} sólo interaccionaría con determinados intermediarios de reacción, mientras que el primer Mg^{2+} siempre se encontraría unido a la bomba. Si el Al^{3+} ocupara el sitio de Mg^{2+} , éste debería ser el sitio disponible en la enzima, y no el sitio que aparece cuando la bomba se fosforila durante el ciclo de reacción, debido a que no existe inhibición cuando la PMCA comienza a ciclar.

La presencia de más de un sitio de unión a Mg^{2+} , sumado al hecho de las diferentes funciones que éste cumple durante el ciclo de reacción, hacen que resulte muy difícil explicar la inhibición por Al^{3+} mediante un simple mecanismo de inhibición competitiva. Sin embargo, si consideramos que el Mg^{2+} en las P-ATPasas está involucrado tanto en la estabilización de la forma fosforilada como en la aceleración de la desfosforilación, parecería que el mecanismo de inhibición por Al^{3+} en la PMCA sería a través de impedir que el Mg^{2+} cumpla con su función.

6.6 Comparación de las inhibiciones por Al^{3+} en SERCA y PMCA.

El caso de la inhibición por Al^{3+} se presenta como un caso paradigmático dado que estas enzimas poseen al menos dos sitios de unión a cationes en distintas partes de su estructura y por este motivo múltiples formas de ser inhibidas por Al^{3+} . En la Fig. 6.7 se muestra un esquema combinado de cómo sería la inhibición tanto en SERCA como en PMCA. En el caso de la SERCA, el esquema muestra que la enzima activa E se encuentra impedida de entrar en el ciclo catalítico dado que es llevada a formar un complejo $E\text{Al}$ (donde el Al^{3+} ocuparía el lugar del Ca^{2+}). En el caso de la PMCA se formaría un complejo $E\text{PAI}$ luego de agregar ATP (donde el Al^{3+} ocuparía el lugar o un lugar cercano al Mg^{2+}).

¿Por qué ocurriría este mecanismo diferente en estas dos Ca^{2+} -ATPasas?

A pesar de las grandes similitudes entre estas dos enzimas, existen al menos dos diferencias fundamentales que podría ayudar a responder esta pregunta:

- (1) la SERCA posee dos sitios de unión a Ca^{2+} , el sitio I tiene gran afinidad por el catión (en el orden de pM) y la unión del segundo Ca^{2+} al sitio II es cooperativa.

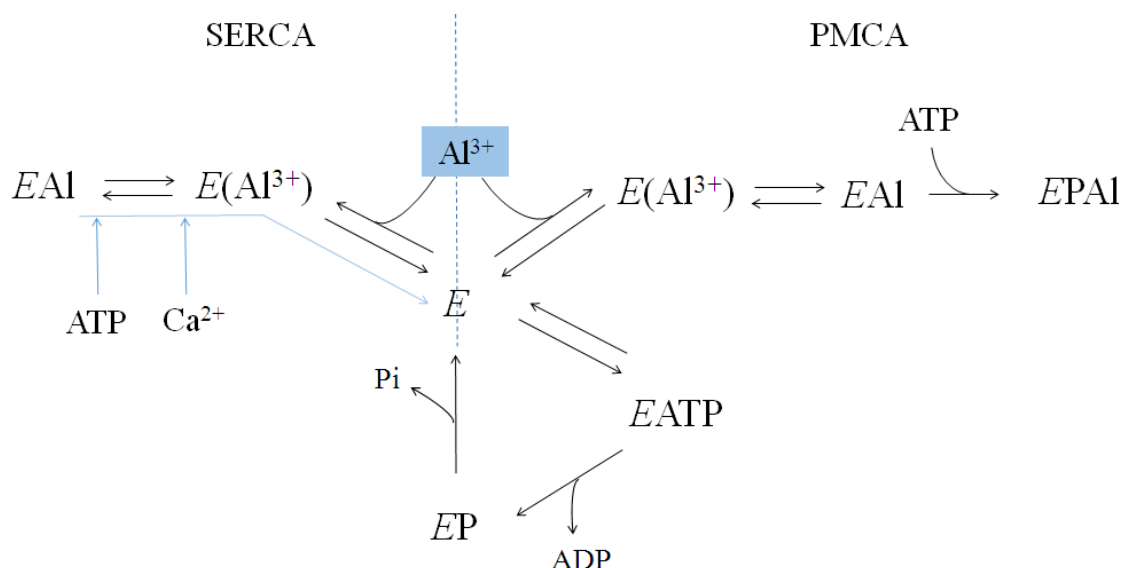


Figura 6.7. Esquema donde se muestra simultáneamente el mecanismo de inhibición de SERCA y PMCA. En azul se muestra que la unión de ATP y Ca^{2+} aceleran la recuperación de

La afinidad aparente por Ca^{2+} ($0.9 \mu\text{M}$ en nuestras condiciones experimentales) refleja la unión a ambos sitios, situación necesaria para que la bomba alcance la conformación correcta para hidrolizar ATP. En el caso de la PMCA, el sitio I está ausente por lo que transporta un único ión por molécula de ATP, con una afinidad aparente mucho menor ($12 \mu\text{M}$ en nuestras condiciones experimentales).

- (1) Ambas bombas utilizan Mg^{2+} como cofactor con afinidades aparentes no tan diferentes como en el caso del Ca^{2+} (PMCA: $100 \mu\text{M}$ y SERCA: $25 \mu\text{M}$).

De esta forma, la diferencia entre los sitios de unión a estos iones en ambas bombas, puede ser responsable de que el Al^{3+} interaccione de manera preferencial con uno u otro y, consecuentemente, el mecanismo de inhibición resulte diferente. Es posible que el Al^{3+} tenga la capacidad de unirse a ambos sitios en ambas bombas, es decir, también al sitio de Mg^{2+} en la SERCA y el sitio de Ca^{2+} en la PMCA, pero esa unión ocurriría cuando las bombas ya están inhibidas.

CAPÍTULO VII

Dentro de los probables grupos con los que interacciona el Al^{3+} , se encuentran los grupos fosfato. Junto con el desplazamiento del Ca^{2+} o el Mg^{2+} de los sitios de unión a proteínas, este tipo de interacción fue propuesta como un mecanismo de inhibición de enzimas que se fosforilan (Jones y Kochian, 1996). También fue descrito que el Aluminio produce peroxidación lipídica porque interacciona con los grupos fosfato de los fosfolípidos que forman las membranas celulares (Verstraeten y Oteiza, 2002).

Nuestros resultados muestran que, tanto la PMCA como la SERCA, son inhibidas por Aluminio en presencia de varios quelantes mediante un proceso que depende de todas las variables que conforman el sistema en el que se encuentran la enzima y este catión. Sin embargo, a pesar de que un sistema invitro es complejo, la complejidad de un sistema celular es muchísimo mayor.

En este contexto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si el mecanismo de inhibición propuesto para las enzimas aisladas era posible en un sistema más parecido al fisiológico. Es decir ¿cuál es la relevancia fisiológica de nuestros resultados en las enzimas aisladas? ¿el Al^{3+} puede interaccionar con la PMCA en una célula o las condiciones del sistema hacen imposible que ello suceda? ¿el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmático producido por la exposición a AlCl_3 puede involucrar la inhibición de esta Ca^{2+} -ATPasa? Los resultados que presentamos en este Capítulo intentan responder estas preguntas utilizando a la PMCA como modelo.

7.1. EL ALUMINIO INHIBE A LA PMCA EN DISTINTOS ENTORNOS LIPÍDICOS

La PMCA es regulada por su entorno lipídico. En el caso de los fosfolípidos neutros, las características de las bicapas la rodean a la enzima tienen efectos sobre su estructura y, consecuentemente, sobre su función (Pignataro y col., 2015). Aunque por un mecanismo diferente, la PMCA también es regulada por fosfolípidos ácidos como fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilinositol (PI). Similar a la que ocurre con la calmodulina, la interacción de estos fosfolípidos con un sitio específico de la bomba, provocan un cambio conformacional que la llevan a un estado activado en el que la afinidad aparente por Ca^{2+} y la velocidad de la enzima son máximas (Mangialavori y col., 2011).

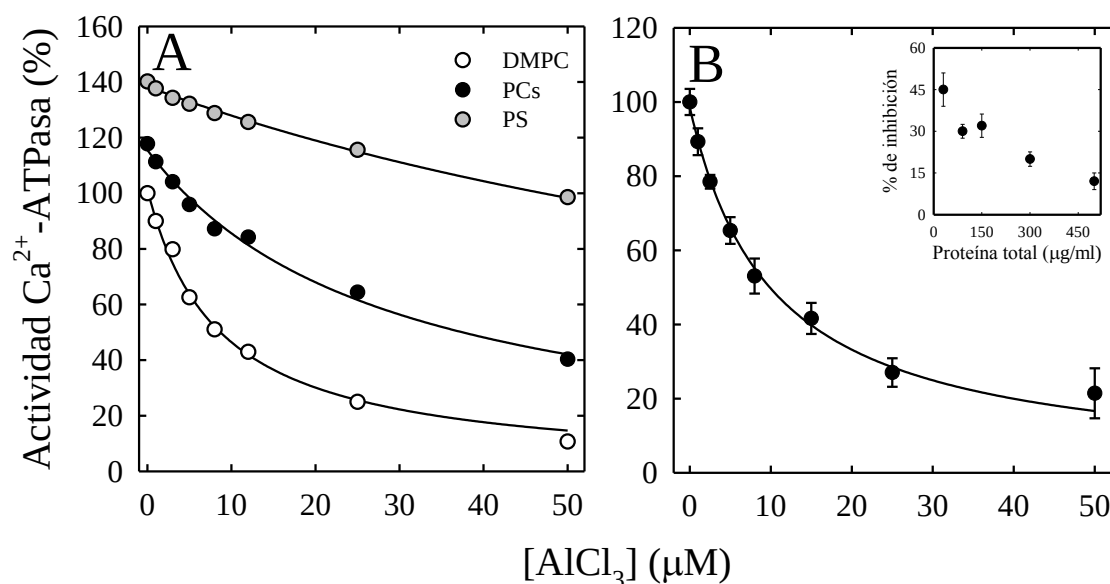


Figura 7.1. (A) Actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA reconstituida con fosfolípidos neutros (DMPC); fosfolípidos de soja (PCs) o fosfolípidos ácidos (PS), en función de la concentración de AlCl_3 . La actividad de la bomba reconstituida con DMPC y en ausencia de AlCl_3 fue tomada como 100%. **(B)** Actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en membranas de eritrocitos humanos en función de la concentración de AlCl_3 . La actividad de la bomba en ausencia de AlCl_3 fue tomada como 100%. Las líneas llenas representan el ajuste de la 4.2 a los datos experimentales. *Inset.* % de inhibición producido por 10 μM AlCl_3 sobre actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA para distintas concentraciones de proteína totales en membranas de eritrocitos. Experimentos representativos de 2 experimentos independientes

Para estudiar el efecto de los fosfolípidos que rodean a la bomba sobre la inhibición por Al^{3+} evaluamos 4 modelos: (1) fosfatidilcolina de soja (PCs); (2) fosfatidilserina (PS); (3) membrana plasmática de eritrocitos (membrana nativa) y; (4) DMPC (como control). La estrategia experimental es la misma que en el Capítulo anterior, es decir, la enzima es reconstituida según cada caso e incubada en condiciones óptimas durante 10 min. Luego de este tiempo, la reacción se inicia por el agregado de ATP.

La Fig. 7.1A muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la $[\text{AlCl}_3]$ cuando la bomba fue reconstituida con DMPC (control); PCs o PS.

Para los 4 sistemas ensayados, los datos son descriptos por la Ec. 4.2 como en los casos anteriores. La Tabla 7.1 muestra los resultados obtenidos para todos los parámetros.

Tabla 7.1. Parámetros obtenidos de los ajustes de las Ec. 4.2 y 4.5 a los resultados mostrados en la Fig. 7.1

	v_0 (%)	K_{Al} (μM)
DMPC	$101,4 \pm 2,2$	$8,4 \pm 0,6$
PCs	$111,5 \pm 1,6$	$28,6 \pm 1,9$
PS	$149,4 \pm 2,3$	$122,7 \pm 4,5$
Membranas de eritrocitos	$100,2 \pm 0,3$	$10,2 \pm 0,7$

Acorde a la presencia de distintas cantidades de fosfolípidos ácidos, los valores de V_0 fueron $\text{PS} > \text{PCs} > \text{DMPC}$. Mientras que la constante de afinidad aparente para la inhibición por AlCl_3 (K_{Al}) fue: $\text{PS} < \text{PCs} < \text{DMPC}$.

La Fig. 7.1B muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en membranas de eritrocitos (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína total) y en función de la concentración de AlCl_3 . La línea llena representa el ajuste de la Ec. 4.2 a los datos experimentales. El valor de K_{Al} obtenido no fue significativamente diferente de la bomba reconstituida en DMPC (Tabla 7.1).

La cantidad de PMCA en las membranas de eritrocitos es aproximadamente el 0.1% del total de las proteínas. De manera que, a diferencia de lo que ocurre con la bomba purificada y reconstituida, en este sistema se incorporan otras proteínas intrínsecas como componentes. Para evaluar si en las membranas, la cantidad de proteína total y/o la cantidad de lípidos, tienen un efecto sobre la inhibición por el aluminio, las membranas fueron diluidas en distintas proporciones e incubadas con 10 μM AlCl_3 . La Figura 7.1B (*inset*) muestra el porcentaje de inhibición de la PMCA producido por 10 μM AlCl_3 en función de las proteínas totales en las membranas. Si bien los resultados se expresan en función de las proteínas totales, los lípidos que forman las membranas también son diluidos. Por lo tanto, el efecto observado tras la dilución corresponde al efecto que potencialmente tengan tanto los lípidos como las proteínas presentes.

Congruente con la hipótesis de que los componentes que participan en el sistema, también participan del equilibrio del AlCl_3 , cuando la cantidad de proteínas totales (y lípidos) en el medio aumenta, disminuye el porcentaje de inhibición de la PMCA.

7.2. EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL FLUJO DE CALCIO Y SU VINCULACIÓN CON LA PMCA: ESTUDIOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS INTACTAS.

Hasta aquí hemos descripto el efecto del Aluminio sobre la PMCA y SERCA en sistemas aislados. Es evidente que la complejidad del sistema influye en la interacción entre la PMCA y el Al^{3+} pero

¿es posible que el Al^{3+} interaccione con la PMCA en una célula viva o el mecanismo propuesto sólo es posible cuando la bomba está aislada?

Para intentar responder esta pregunta, estudiamos el flujo de calcio en células HEK293T (del inglés, *Human Embionaric Kidney*) en condiciones experimentales que nos permiten atribuir el efecto observado a la PMCA, en este sentido podremos conocer el impacto que podría tener el Aluminio en el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática.

Para evaluar la contribución de la PMCA al mantenimiento del nivel intracelular de calcio, estudiamos la cinética del flujo de calcio luego de la aplicación de un estímulo que desencadenó su entrada al citosol de las HEK293T. El nivel de calcio citoplasmático fue determinado de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

El modelo experimental que utilizamos consistió en exponer a las células a tapsigargina (TG) en ausencia de Ca^{2+} . Este tratamiento produce la inhibición de la SERCA con el consiguiente vaciamiento de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE) y el aumento transitorio en la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). La Fig. 7.2 muestra un esquema del sistema.

La depleción de Ca^{2+} del RE produce la activación de los canales SOCs (*store operated channels*). Éstos permiten el ingreso de Ca^{2+} del medio extracelular hacia el citosol, que luego es removido por la activación de los mecanismos de remoción del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A pesar de estos mecanismos de control, no es posible remover todo el Ca^{2+} del citoplasma y la célula alcanza un nuevo estado estacionario cuya $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es mayor.

El uso de tapsigargina, además de formar parte del estímulo, aporta la ventaja de inhibir a la SERCA, uno de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} citosólico. Por otro lado, para inhibir el efecto del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sobre el eflujo del Ca^{2+} , se reemplazó al Na^+ por cloruro de colina en el medio extracelular. En estas condiciones experimentales, el eflujo de Ca^{2+} estaría mayoritariamente mediado por la PMCA, por lo que es posible estudiar su aporte a la cinética de este proceso.

Si bien la cinética de flujo de Ca^{2+} se puede estudiar en cualquiera de las dos etapas, se utilizará la segunda fase ya que al ser de mayor magnitud es la apropiada para estudiar cambios en el flujo de Ca^{2+} . Con el propósito de estudiar el efecto del AlCl_3 sobre el flujo de Ca^{2+} , las células fueron incubadas durante 30 minutos en presencia y ausencia de $25 \mu\text{M}$ AlCl_3 . Se incorporó un control donde las células fueron incubadas en presencia de $100 \mu\text{M}$ LaCl_3 , este compuesto inhibe a los canales SOCs a pesar de su previa activación por la depleción del Ca^{2+} del RE (Aussel y col., 1996).

En la Figura 7.3A se muestra un experimento representativo realizado en las condiciones mencionadas. La respuesta medida fue la intensidad de fluorescencia que acompaña la unión del fluoróforo a Ca^{2+} y se expresó como respuesta relativa a la línea de base (Aung y col., 2009). Se puede observar que tanto en presencia como en ausencia de $25 \mu\text{M}$ AlCl_3 hay un aumento del Ca^{2+} en el citosol posterior al impulso de Ca^{2+} . Nótese que en presencia de La^{III} no se observa un aumento del Ca^{2+} citosólico debido a que los SOCs se encuentran inhibidos.

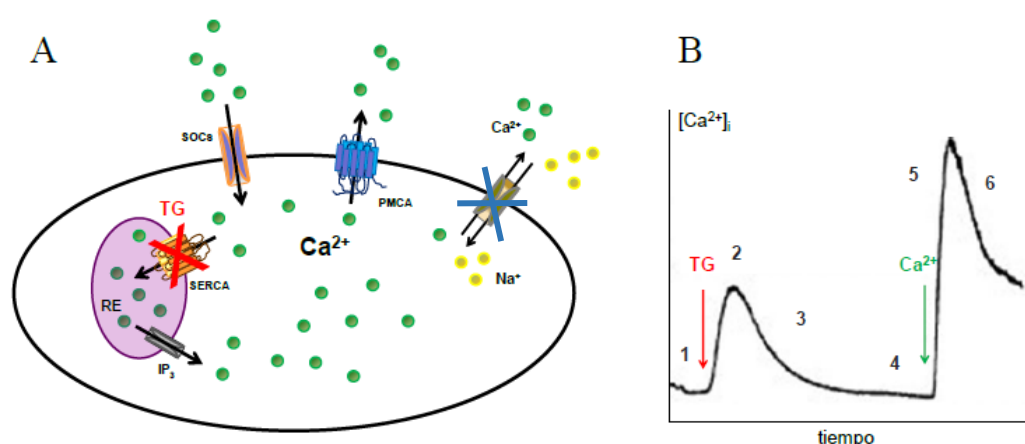


Figura 7.2. Esquema del transporte de Ca^{2+} y su registro experimental (tomado de la Tesis Doctoral de la Dra. Dalghi, con algunas modificaciones). **A.** La entrada del Ca^{2+} extracelular al citosol a través de canales SOC (store operated channels) se estimula por agotamiento de los depósitos intracelulares lo que se logra inhibiendo a la SERCA con tapsigargina (TG). La remoción del Ca^{2+} citosólico al espacio extracelular se lleva a cabo por la PMCA y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. En este esquema se obvió la participación de la mitocondria. RE: retículo endoplásmico. **B.** Perfil del registro de la señal asociada a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en función del tiempo para el esquema experimental descrito en A: (1) El transporte de Ca^{2+} se encuentra en estado estacionario, lo que constituye el nivel basal de la señal, (2) ante la aplicación de TG se inhibe la SERCA lo que resulta en un aumento transitorio del Ca^{2+} citosólico que (3) es exportado hacia el espacio extracelular por la PMCA y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, quelado por proteínas citosólicas y transportado hacia el interior de la mitocondria con lo que (4) se retorna al nivel basal. Ante el agregado de Ca^{2+} al medio extracelular, (5) los SOC transportan el catión hacia el citoplasma con lo que aumenta en gran medida la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Nuevamente, (6) los mecanismos de remoción de Ca^{2+} se ponen en marcha para retornar al estado estacionario, aunque en este caso se alcanza a una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mayor.

Sin embargo, el aumento del Ca^{2+} citosólico ocurre con una pendiente inicial similar en ausencia y presencia de AlCl_3 (Fig. 7.3B), lo que sugiere que el AlCl_3 no estaría afectando el funcionamiento de los SOC, y en consecuencia, la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular al citosol.

A partir de los datos mostrados en la figura Fig. 7.3A se cuantificó el flujo de Ca^{2+} obtenido mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC) (Fig. 7.3C). El AUC está comprendido entre el agregado de Ca^{2+} , el punto experimental registrado que alcanza el estado estacionario y el valor máximo alcanzado (pico) luego del agregado de Ca^{2+} como está descrito en la literatura (Giacomello y col., 2011). Estos valores se refirieron a la respuesta de las células en ausencia de AlCl_3 , que fue tomada como 100%.

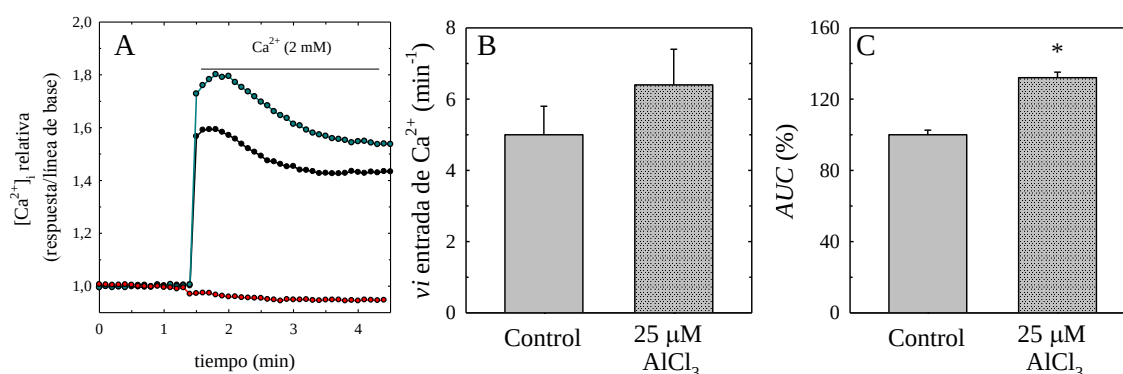


Figura 7.3. (A) Efecto del AlCl_3 sobre la dinámica del Ca^{2+} citosólico en células HEK293T. La intensidad de fluorescencia se registró para la condición: control (●), 25 μM AlCl_3 (●) y 100 μM AlCl_3 (●) posterior al agregado de 2 mM CaCl_2 . **(B) (C)**

Como se puede observar en la Fig. 7.3C, el AUC obtenido en presencia de AlCl_3 es 32.0 ± 3.1 % mayor respecto del control. Debido a que el AUC es la resultante de la entrada y salida del Ca^{2+} a la célula y a que el AlCl_3 no afecta el funcionamiento de los canales SOC (entrada de Ca^{2+}), un aumento del AUC estaría directamente relacionado con una disminución del funcionamiento de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} . Dado que se trabajó en condiciones experimentales donde la PMCA sería el principal mecanismo de expulsión de Ca^{2+} , este resultado sugiere que el tratamiento con AlCl_3 afectaría principalmente el funcionamiento de la PMCA en las células HEK293T disminuyendo su actividad.

De acuerdo a este resultado, el Aluminio tendría un efecto sobre el eflujo de Ca^{2+} . Para confirmar este hecho, estudiamos el efecto de diferentes concentraciones de AlCl_3 . Para ello se realizó un experimento similar al descrito en la Fig. 7.3 pero las células HEK293T fueron preincubadas con diferentes concentraciones de AlCl_3 .

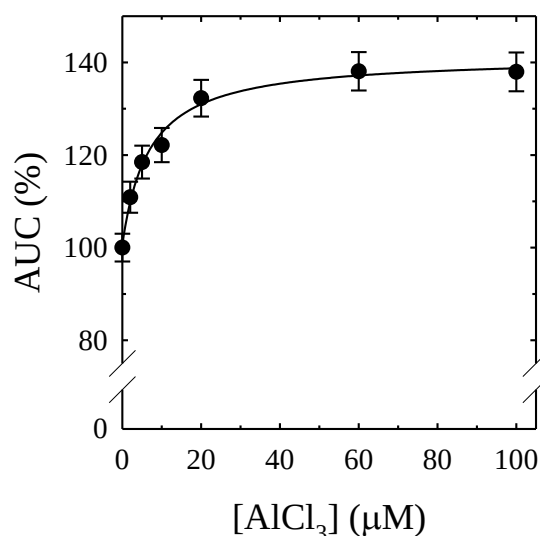


Figura 7.4. Cuantificación del efecto observado en curvas como se muestran en Fig. 7.3A en términos del área bajo la curva (*AUC*) relativo a las células control (respuesta tomada como 100%) luego del agregado de Ca^{2+} .

La Fig. 7.4 muestra como el *AUC* aumenta con el incremento de la concentración de AlCl_3 . Una función hiperbólica creciente más una constante, como la ecuación 7.1, es la que mejor describe la variación de los valores de *AUC* con la concentración de AlCl_3 .

$$AUC = AUC_0 + \frac{(AUC_{\max} - AUC_0) \cdot [Al]}{K_{Al} + [Al]} \quad \text{Ec. 7.1}$$

Donde AUC_0 y $AUC_{\max}$ es el área bajo la curva en ausencia de AlCl_3 y cuando su concentración tiende a infinito, respectivamente, y K_{Al} es la concentración de AlCl_3 para la cual *AUC* es igual a $(AUC_{\max} - AUC_0)/2$. Los valores de K_{Al} y de $AUC_{\max}$ obtenidos fueron: $6.8 \pm 1.3 \mu\text{M}$ y $141.2 \pm 3.8 \%$, respectivamente

Como se ha descrito anteriormente, un aumento del *AUC* estaría directamente relacionado con una disminución del funcionamiento de la PMCA. Este resultado sugiere que a medida que aumenta la concentración de AlCl_3 disminuye la actividad de la PMCA en las células HEK293T. La dependencia observada del *AUC* con la concentración de AlCl_3 demuestra un comportamiento propio de un sistema saturable, en el que estaría involucrada la PMCA y por lo tanto, indicaría que el efecto de AlCl_3 sobre el *AUC* no es inespecífico.

En conclusión, los resultados descriptos sugieren que el efecto observado del AlCl_3 sobre sistemas aislados de la PMCA podría ocurrir a nivel celular.

CONCLUSIONES GENERALES

El aluminio es uno de los elementos más abundante en la tierra, representa aproximadamente el 8% en peso de la tierra de superficie sólida. No es un elemento esencial para la vida, por el contrario ha sido relacionado con desordenes neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer's y Pakirson (Clatzo y col., 1965; Grape y col., 1973)

El aluminio tiene un solo estado de oxidación, Al^{3+} . Al^{3+} tiene alta afinidad por grupos cargados negativamente, por lo que interacciona con distintos grupos presentes en moléculas biológicas. La velocidad de disociación de los complejos que forma el Al^{3+} , es muy lenta comparada con otros metales. Por ejemplo, la velocidad de intercambio del Mg^{2+} es 10^5 veces más rápida que la del Al^{3+} , por lo que el Al^{3+} inhibe procesos donde el Mg^{2+} es utilizado como cofactor. También inhibe procesos dependientes de Ca^{2+} , ya que éste tiene una velocidad de intercambio 10^8 veces mayor que el Al^{3+} (Kawahaca y col., 2011). El Al^{3+} también interacciona con grupos fosfato y por ello afecta la fosforilación y desfosforilación de proteínas (51-57 review), la estructura del DNA (Oshiro y col., 1998) y las características biofísicas de las membranas biológicas (Verstraeten y col., 2002; Pandya y col., 2004).

Las bombas de calcio de membrana plasmática (PMCA) y de retículo sarcoplásmico (SERCA) forman parte de los mecanismos celulares para regular el $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ambas bombas utilizan ATP como fuente de energía para transportar Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el exterior celular o hacia el lumen del retículo sarcoendoplásmico, respectivamente. La PMCA y la SERCA pertenecen a la familia de la P-ATPasas, cuya característica diferencial es la formación, dependiente de Mg^{2+} , de un intermediario fosforilado ácido estable durante el ciclo de transporte de Ca^{2+} . Estas características convierten a la PMCA y la SERCA en blancos potenciales para la inhibición por aluminio.

En este trabajo estudiamos y caracterizamos el efecto del aluminio sobre la PMCA y la SERCA. Los resultados presentados permiten obtener las siguientes conclusiones generales:

- (1) A pesar de las similitudes entre ambas bombas, la PMCA y la SERCA son inhibidas por aluminio por un mecanismo diferente
- (2) La especie que produciría la inhibición en ambas bombas es el Al^{3+}
- (3) El Al^{3+} sólo se une a la PMCA y la SERCA en ausencia de ATP, es decir que cuando las bombas comienzan a ciclar no puede unirse. Este hecho descarta que la inhibición de ambas bombas ocurra por la unión de Al^{3+} al grupo fosfato de la bomba fosforilada (EP) o por la unión del complejo ATP-Al^{3+} . En concordancia con esto último, la constante de inhibición aparente de las enzimas por AlCl_3 es similar en presencia de 2 o 0.03 mM ATP.
- (4) En ausencia de ATP, el Al^{3+} se disocia muy lentamente de las bombas. Este hecho explicaría porque, siendo tan pequeña la concentración de Al^{3+} a pH neutro, sería la especie que produce la inhibición.
- (5) En presencia de ATP, el Al^{3+} se disocia de la SERCA y la enzima libre recupera la actividad Ca^{2+} -ATPasa. Este hecho apoya la conclusión de que la inhibición por Al^{3+} es reversible (no covalente).
- (6) En la SERCA, el Al^{3+} interaccionaría con el sitio(s) de unión a Ca^{2+} . En concordancia con ello, cuando se agrega ATP al sistema, la unión de Al^{3+} impide la fosforilación de la bomba.

- (7) En la PMCA, el complejo Enzima- Al^{3+} es capaz de unir ATP y fosforilarse, congruente con el hecho de que Ca^{2+} este unido a la enzima (E_1Ca) pero el Al^{3+} impediría la desfosforilación. Si bien no observamos un efecto protector del Mg^{2+} sobre la inhibición, la defosforilación de la bomba es mediada por este cofactor, por lo que el Al^{3+} estaría interfiriendo con la función del Mg^{2+} .
- (8) Si bien el Al^{3+} se uniría a los fosfolípidos, ello no impide la inhibición de las bombas. En congruencia con ello, distintos entornos lipídicos sólo tienen un efecto sobre la concentración de AlCl_3 para producir la inhibición.
- (9) Nuestros resultados muestran que el AlCl_3 inhibe el eflujo de Ca^{2+} citoplasmático mediado por PMCA en células HEK293 sugiriendo que la PMCA puede ser inhibida por Al^{3+} *in-vivo*.

Si bien el mecanismo de inhibición por Al^{3+} en la PMCA y en la SERCA aisladas podría ser diferente al que ocurre *in-vivo*, este trabajo demuestra por primera vez que estas bombas estarían involucradas en los efectos adversos producidos por la exposición a aluminio.

REFERENCIAS

- Abd-Elghaffar SK, El-Sokkary GH and Sharkawy (2005) Aluminum-induced neurotoxicity and oxidative damage in rabbits: protective effect of melatonin. *Neuroendocrinology letters*. **26**:609-16
- Adamo HP, Rega AF and Garrahan PJ (1990) The E_2 in equilibrium E_1 transition of the Ca^{2+} -ATPase from plasma membranes studied by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **265**:3789-92.
- Adebayo AO, Enyedi A, Verma AK, Filoteo AG and Penniston JT (1995) Two residues that may ligate Ca^{2+} in transmembrane domain six of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* **270**:27812-6
- Altmann P, Cunningham J, Dhanesha U, Ballard M, Thompson J and Marsh F (1999) Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. *British Medical Journal*. **319**:807-11.
- Andersen JP, Jørgensen PL and Møller JV (1985) Direct demonstration of structural changes in soluble, monomeric Ca^{2+} -ATPase associated with Ca^{2+} release during the transport cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **82**: 4573-7.
- Aung CS, Ye W, Plowman G, Peters AA, Monteith GR and Roberts-Thomson SJ (2009) Plasma membrane calcium ATPase 4 and the remodeling of calcium homeostasis in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* **30**:1962-9
- Aussel C, Marhaba R, Pelassy C and Breittmayer JP (1996) Submicromolar La^{3+} concentrations block the calcium release-activated channel, and impair CD69 and CD25 expression in CD3- or thapsigargin-activated Jurkat cells. *Biochem. J.* **313**:909–13
- Ball, EH (1986) Quantitation of proteins by elution of coomassie brilliant blue R from stained bands after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **155**:26-27
- Bancher C, Lassmann H, Breitschopf H, Jellinger KA (1997) Mechanisms of cell death in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* **50**:141–152.
- Barrabin H, Garrahan PJ and Rega AF (1980) Vanadate inhibition of the Ca^{2+} -ATPase from human red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **600**:796-804.
- Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F and Lipp P (2001) Calcium signalling-an overview. *Semin. Cell Dev. Biol.* **1**:3-10.

- Brodin P, Falchetto R, Vorherr T and Carafoli E (1992) Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca^{2+} pump. *Eur. J. Biochem.* **204**:939-46
- Burdakov D, Petersen OH and Verkhatsky A (2005) Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. *Cell Calcium.* **38**:303-10.
- Bush AI and Tanzi RE (2008) Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics*, **5**:421-32.
- Canales JJ, Corbalan R and Montoliu C (2001) Aluminium impairs the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in cultured neurons and in rat brain in vivo: molecular mechanisms and implications for the neuropathology. *J. of Inorg. Biochem.* **87**:63-69
- Carafoli E (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56**:395-433
- Caroni P and Carafoli E. (1981) The Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma. Characterization, calmodulin dependence, and partial purification. *J. Biol. Chem.* **256**:3263-70.
- Castello PR, Caride AJ, Gonzalez Flecha FL, Fernandez HN, Rossi JP and Delfino JM. (1994) Identification of transmembrane domains of the red cell calcium pump with a new photo-activatable phospholipidic probe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**:194-200.
- Castello PR, Gonzalez Flecha FL, Caride AJ, Fernandez HN, Delfino JM and Rossi JP (1997) The membrane topology of the amino- terminal domain of the red cell calcium pump. *Protein Sci.* **6**:1708-17.
- Champeil P, Gingold MP, Guillain F, and Inesi G (1983) Effect of magnesium on the calcium-dependent transient kinetics of sarcoplasmic reticulum ATPase, studied by stopped flow fluorescence and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **258**: 4453-8
- Cheug WY (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* **207**: 19-27.
- Coan C, Scales DJ and Murphy AJ (1986) Oligovanadate binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. Evidence for substrate analogue behavior. *J. Biol. Chem.* **261**:10394-403.
- Collyer CA, Henrik K and Blow DM (1990) Mechanism for Aldose-Ketose Interconversion by D-Xylose Isomerase Involving Ring Opening Followed by a 1,2 Hydride Shift. *J. Mol. Biol.* **212**:211-35.
- Colowick S and Womack F. (1979) Proton-dependent inhibition of yeast and brain hexokinases by aluminium in ATP preparations. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:5080-5084.
- Corradi GR and Adamo HP (2007) Intramolecular fluorescence resonance energy transfer between fused autofluorescent proteins reveals rearrangements of the N- and C-terminal segments of the plasma membrane Ca^{2+} pump involved in the activation. *J. Biol. Chem.* **282**:35440-8.
- Corre F, Jaxel C, Fuentes J, Menguy T, Falson P, Levien BA, Moller JV and le Maire M (2003) Involvement of the cytoplasmic loop L6-7 in the entry mechanism for transport of Ca^{2+} through the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**:90-5
- Crapper DR, Krishnan SS and Dalton AJ (1973) Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* **180**:511-513
- Dalghi M. "Estudio de la Regulación de la Bomba de Calcio de Membrana Plasmática por el Citoesqueleto de Actina". *Tesis Doctoral*, 2013.
- Davis FM, Peters AA, Grice DM, Cabot PJ, Parat MO, Roberts-Thomson SJ and Monteith GR. (2012) *PLoS One.* 7:e36923
- de Meis L and Vianna AL (1979) Energy interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **48**:275-92.
- De Tezanos Pinto F and Adamo HP (2002) Deletions in the acidic lipid-binding region of the plasma membrane Ca^{2+} pump. A mutant with high affinity for Ca^{2+} resembling the acidic lipid- activated enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**:12784-9
- Diaz-Nido J and Avila J (1990) Aluminum induces the in vitro aggregation of bovine brain cytoskeletal proteins. *Neuroscience Lett.* **110**:221-6.
- Dupont Y (1982) Low-temperature studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Mechanisms of calcium binding. *Biochim. Biophys. Acta.* **688**:75-87.
- Echarte MM, Levi V, Villamil AM, Rossi RC and Rossi JP (2001) *Anal Biochem.* **289**:267-73.
- El-Sebae AH, Abdel-Ghany ME, Shalloway D, Zeid MMA, Blancato J and Saleh MA (1993) Aluminium interaction with human brain tau protein phosphorylation by various kinases. **28**:763-77

- Engelman DM, Chen Y, Chin CN, Curran Ar, Dixon AM, Dupuy AD, Lee AS, Lehnert U, Matthews EE, Reshetnyak YK, Senes A and Popot JL (2003) Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett.* **555**:122-5
- Enyedi A, Flura M, Sarkadi B and Gardos G and Carafoli E (1987) The maximal velocity and the affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J. Biol. Chem.* **262**:6425-30
- Exley C (1999) A molecular mechanism of aluminium-induced Alzheimer's disease? *J. Inorg. Biochem.* **76**:133-40
- Exley C (2006) Aluminium and iron, but neither copper nor zinc, are the key to the precipitation of beta-sheets of A β 42 in senile plaque cores in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **10**:173-7.
- Exley C (2007) Organosilicon therapy in Alzheimer's disease?. *J. Alzheimer's Dis.* **11**:301-2
- Falchetto R, Vorherr T and Carafoli E (1992) The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci.* **12**:1613-21
- Filomatori CV and Rega AF (2003) On the mechanism of activation of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase by ATP and acidic phospholipids. *J. Biol. Chem.* **278**:22265-71.
- Filoteo AG, Gorski JP and Penniston JT (1987) The ATP-binding site of the erythrocyte membrane Ca²⁺ pump. Amino acid sequence of the fluorescein isothiocyanate-reactive region. *J. Biol. Chem.* **262**:6526-30.
- Filoteo AG, Enyedi A and Penniston JT. (1992) The lipid-binding peptide from the plasma membrane Ca²⁺ pump binds calmodulin, and the primary calmodulin-binding do-main interacts with lipid. *J. Biol. Chem.* **267**:11800-5.
- Fiske, C.H. and Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* **179**: 66-71
- Fraser RDB and Suzuki E (1973) The use of least squares in data analysis. Physical principles and techniques of protein chemistry. Part. C (Leach S. J. ed) Academic press, New York. 301-355
- Frisardi V, Solfrizzi V, Capurso C, Kehoe PG, Imbimbo BP, Santamato A *et al* (2010) Aluminum in the diet and Alzheimer's disease: from current epidemiology to possible disease-modifying treatment. *J. Alzheimer's dis.* **20**:17-30
- Forbes WF, Gentleman JF and Park E (1995) Dementia and age at death. *Exp. Gerontol.* **30**:445-53
- Ganrot P (1986) Metabolism and Possible Health Effects of Aluminium. *Env. Health Persp.* **65**:363-441
- Garcia ME, Del Zotto H, Caride AJ, Filoteo AG, Penniston JT, Rossi JP and Gagliardino JJ (2002) Expression and cellular distribution pattern of plasma membrane calcium pump isoforms in rat pancreatic islets. *J. Membr. Biol.* **185**:17-23.
- Garrahan PJ, Rega AF and Alonso GL (1976) The interaction of magnesium ions with the calcium pump of sarcoplasmic reticulum. *Bioch. Biophys. Acta* **448**:121-31.
- Garrahan PJ and Rega AF (1978) Activation of partial reactions of the Ca²⁺-ATPase from human red cells by Mg²⁺ and ATP. *Biochim. Biophys. Acta.* **513**:59-65.
- Garrison Sposito (1995) The environmental chemistry of Aluminum, Second Edition.
- Gérczei T, Böcksei Z, Szabó E, Asbóth B and Naráy-Szabó G (1999) Structure determination and refinement of the Al³⁺ complex of the D254,256E mutant of Arthrobacter D-xylose isomerase at 2.40 Å resolution. Further evidence for inhibitor-induced metal ion movement. *Int. J. Biol. Macromol.* **4**:329-36
- Guerini D and Carafoli E (1999) The calcium pumps. Calcium as a cellular regulator. Oxford University Press, New York. 249-78
- Guerini D, Coletto L and Carafoli E (2005) Exporting calcium from cells. *Cell Calcium.* **38**:281-9
- Ghribi O, Herman MM, Forbes MS, DeWitt D and Savory J (2001) GDNF protects against aluminum-induced apoptosis in rabbits by upregulating Bcl-2 and Bcl-X and inhibiting mitochondrial Bax translocation. *Neurobiol. Dis.* **5**:764-73
- Giacomello M, De Mario A, Lopreiato R, Primerano S, Campeol M, Brini M and Carafoli E (2011) Mutations in PMCA2 and hereditary deafness: a molecular analysis of the pump defect. *Cell Calcium.* **50**:569-76
- Crapper GR, Krishnan SS and Dalton AJ (1973) Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* **180**:511-3
- Greger JL (1993) Aluminum metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **13**:43-63
- González Flecha FL, Castello PR, Gagliardino JJ and Rossi JP (1999) Molecular characterization of the glycosylated plasma membrane calcium pump. *J. Membrane Biol.* **171**:25-34
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem* **59**:1609-23
- Haseelbach W (1978) The Reversibility of the sarcoplasmic calcium pump. *Biochem. et Biophys. Acta.* **515**: 23-53
- Herscher CJ and Rega AF (1996) Pre-steady-state kinetic study of the mechanism of inhibition of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase by lanthanum. *Biochemistry* **35**:14917-22
- Hegde ML, Bharathi P and Suram A (2009) Challenges associated with metal chelation therapy in alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **17**:457-68

- Holmes LP, Cole DL and Eyring EM (1968) Kinetics of aluminum ion hydrolysis in dilute solutions. *J. Phys. Chem.* **72**:301-304
- Hoops S, Sahle S, Gauges R, Lee C, Pahle J, Simus N, Singhal M, Xu L, Mendes P and Kummer U (2006) COPASI a complex pathway simulator. *Bioinforma-tics* **22**:3067-74
- Howlett DR (2003) Protein misfolding in disease: cause or response? *Curr Med Chem-Immun, Endoc Metab Agents* 371–383
- Huang Y, Herman MM, Liu J, Katsetos CD, Wills MR and Savory J (1997) Neurofibrillary lesions in experimental aluminum-induced encephalopathy and Alzheimer's disease share immunoreactivity for amyloid precursor protein, A beta, alpha 1-antichymotrypsin and ubiquitin-protein conjugates. *Brain Res.* **771**:213-20
- Inesi G, Lewis D, Ma H, Prasad A and Toyoshima C (2006) Concerted conformational effects of Ca^{2+} and ATP are required for activation of sequential reaction in the Ca^{2+} -ATPase (SERCA) catalytic cycle. *Biochemistry* **45**:13769–78
- Jackson TR, Patterson SI, Thastrup O, Hanley MR. (1988) A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca^{2+} without generation of inositol phosphates in NG115-401L. Neuronal cells. *Biochem. J.* **253**:81-6
- James P, Zvaritch EI, Shakhparonov MI, Penniston JT and Carafoli E (1987) The amino acid sequence of the phosphorylation domain of the erythrocyte Ca^{2+} ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**:7-12
- James P, Maeda M, Fischer R, Verma AK, Krebs J, Penniston JT and Carafoli E (1988) Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca^{2+} pump of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **263**:2905-10
- Johnson VJ and Sharma RP (2003) Aluminum disrupts the proinflammatory cytokine/neurotrophin balance in primary brain rotation-mediated aggregate cultures: possible role in neurodegeneration. *NeuroToxicology.* **24**:261-268
- Johnson GVW, Cogdill KW and Jope RS (1990) Oral aluminum alters in vitro protein phosphorylation and kinase activities in rat brain. *Neurobiology of Aging.* **11**:209-216
- Jones DL and Kochian LV (1996) Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Lett.* **400**: 51-57
- Kalaria R (2002) Similarities between Alzheimer's disease and vascular dementia. **203-204**:29-34
- Kanazirska M, Vassilev PP, Birzon SY and Vassilev PM (1997) Voltage-dependent effect of Al^{3+} on channel activities in hippocampal neurons. *Biochemical and biophysical Research Communications.* **232**:84-87
- Kaneko N, Sugioka T y Sakurai H (2007) Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: insight into cellular damage caused by oxidative stress. *J. of Inorg Biochem.* **101**:967-75
- Karlish SJ, Beauge LA and Glynn IM (1979) Vanadate inhibits $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$ by blocking a conformational change of the unphosphorylated form. *Nature.* **282**:333-5
- Kaur A, Joshi K, Minz RW and Gill KD (2006) Neurofilament phosphorylation and disruption: a possible mechanism of chronic aluminium toxicity in Wistar rats. *Toxicology.* **219**:1-10
- Kawahara M, Kato-Negishi M, Hosoda R, Imamura L, Tsuda M and Kuroda Y (2003) Brain-derived neurotrophic factor protects cultured rat hippocampal neurons from aluminum maltolate neurotoxicity. *J. of Inorg Biochem.* **97**:124-31
- Kawahara M (2010) Role of calcium dyshomeostasis via amyloid channels in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* **10**:2779–87
- Klatzo I, Wisniewski H and Streicher E (1965) Experimental production of neurofibrillary degeneration I. Light microscopic observation," *J. Neuropathol. Exp. Neurol* **24**:187-99
- Kumar V, Bal A, and Gill KD (2008) Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. *Brain Research.* **1232**:94-103
- Lai JCK and Blass JP (1984) Inhibition of Brain Glycolysis by Aluminium. *J. Neurochem.* **42**:438-445
- Lemire J, Mailloux R, Puiseux-Dao S and Appanna VD (2009) Aluminum- induced defective mitochondrial metabolism perturbs cytoskeletal dynamics in human astrocytoma cells. *J. Neurosci. Res.* **87**:1474-83
- Lukiw WJ, Kruck TPA and Crapper McLachlan DR (1987) Alterations in human linker histone-DNA binding in the presence of aluminum salts in vitro and in Alzheimer's disease. *Neuro Toxicol.* **8**:291-301
- Lukiw WJ, LeBlanc HJ, Carver LA, McLachlan and Bazan HG (1998) Run-on gene transcription in human neocortical nuclei: inhibition by nanomolar aluminum and implications for neurodegenerative disease. *J.Mol. Neurosci.* **11**:67-8
- Lukiw WJ, Percy ME, and Kruck TP (2005) Nanomolar aluminum induces pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primary culture. *J. Inorg. Biochem.* **99**:1895-8

- Luoni L, Buonza MC and de Michelis MI. (2000) H⁺/Ca²⁺ exchange driven by the plasma membrane Ca²⁺-ATPase of Arabidopsis thaliana reconstituted in proteoliposomes after calmodulin-affinity purification. *FEBS Lett.* **482**:225–30
- Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE and MacLennan DH (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* **267**:14483-9
- Mangialavori IC, Villamil-Giraldo AM, Pignataro MF, Ferreira-Gomes M, Caride AJ and Rossi JP (2011) Plasma membrane calcium pump (PMCA) differential exposure of hydrophobic domains after calmodulin and phosphatidic acid activation. *J. Biol. Chem.* **286**:18397-404
- Mantyh PW, Ghilardi JR, Rogers S, DeMaster E, Allen CJ and Stimson ER (1993) Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *J. Neurochem.* **61**:1171–4
- Martin RB (1986a) The Chemistry of Aluminum as Related to Biology and Medicine. *Clin. Chem.* **32**:1797-806
- Martin RB (1986b) Bioinorganic chemistry of metal ion toxicity. *Metal Ions. Biol. Syst.* **20**:21-6
- Masahiro Kawahara and Midori Kato-Negishi (2011) Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int. J Alzheimer's dis.* doi: 10.4061/2011/276393
- Martyn CN, Barker DJ, Osmond C, Harris EC, Edwardson JA and Lacey RF (1989) Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminum in drinking water. *Lancet (London, England)* **1**:59-62
- Mattson MP, Culmsee C, Yu Z and Camandola S (2000) Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* **74**:443-56.
- Mizutani K, Mikami B, Aibara S and Hirose M (2005) Structure of aluminium-bound ovotransferrin at 2.15 Angstroms resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**:1636-1642
- Møller JV, Juul B and le Maire M (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**:1-51.
- Muma NA and Singer SM (1996) Aluminum-induced neuropathology: transient changes in microtubule associated proteins. *Neurotoxicol. Teratology.* **18**:679-90
- Nakagawa T and Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell. Biol.* **150**: 887-94
- Nicholls DG (2005) Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium.* **38**:311-7
- Niggli V, Adunyah ES, Penniston JT and Carafoli E (1981) Purified (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids. *J. Biol. Chem.* **256**:395-401
- Nigli V and Sigel E (2008) Anticipating antiport in P-ATPases. *Trends Biochem. Sci.* **33**:156-60
- Olesen C, Picard M, Winther AM, Gyrupe C, Morth JP, Oxvig C, Møller JV and Nissen P. (2007) The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature.* **450**:1036-42
- Oliveira VH, Nascimento KS, Freire MM, Moreira OC, Scofano HM, Barrabin H and Mignaco JA (2008). Mechanism of modulation of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase by arachidonic acid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **87**:47-53
- Oshiro S, Kawahara M, Mika S et al. (1998) Aluminum taken up by transferrin-independent iron uptake affects the iron metabolism in rat cortical cells. *J. biochem.* **123**:42-46
- Oteiza PI (1994) A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**:374-79.
- Pandya JD, Dave KR and Katyare SS (2004) Effect of longterm aluminum feeding on lipid/phospholipid profiles of rat brain myelin. *Lipids Health Dis.* **3** doi: 10.1186/1476-511X-3-13
- Parhad IM, Krekoski A, Mathew A and Tran PM (1989) Neuronal gene expression in aluminum myelopathy. *Cell.Mol. Neurobiol.* **9**:123-38
- Platt B and Busselberg D (1994) Combined actions of Pb²⁺, Zn²⁺ and Al³⁺ on voltage activated calcium channel currents. *Cell.Mol. Neurobiol.* **14**:831-40
- Pentyala S, Ruggeri J and Veerajulu A (2010) Microsomal Ca²⁺ flux modulation as an indicator of heavy metal toxicity. *Indian J. Exp. Biol.* **48**:737-43
- Picard M, Jensen AM, Sorensen TL, Champeil P, Møller JV and Nissen P. (2007) Ca²⁺ versus Mg²⁺ coordination at the nucleotide-binding site of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Mol. Biol.* **368**:1-7
- Pignataro MF, Dodes-Traian MM, Gonzalez-Flecha FL, Sica M, Mangialavori IC and Rossi JP (2015) Modulation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase by neutral phospholipids: effect of the micelle-vesicle transition and the bilayer thickness. *J. Biol. Chem.* **290**:6179-90

- Sagara Y, Inesi G (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase by thapsigargin at subnano-molar concentrations. *J Biol Chem.* **266**:13503-6.
- Savory J, Rao JK, Huang Y, Letada PR and Herman MM (1999) Age-related hippocampal changes in Bcl-2: Bax ratio, oxidative stress, redox-active iron and apoptosis associated with aluminum-induced neurodegeneration: increased susceptibility with aging. *Neurotoxicol.* **20**:805-17
- Scarborough GA (2003) Why we must move on from the E_1E_2 model for the reaction cycle of the P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**:193-201
- Scharff O, Foder B, Thastrup O, Hofmann B, Møller J, Ryder LP, Jacobsen KD, Langhoff E, Dickmeiss E, Christensen SB, et al. (1988) Effect of thapsigargin on cytoplasmic Ca^{2+} and proliferation of human lymphocytes in relation to AIDS. *Biochim Biophys Acta.* **972**: 257-64
- Shaw CA and Petrick MS (2009) Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neurone degeneration. *J. Inorg. Biochem.* **103**:1555-62
- Shetty K, Veeranna T and Guru SC (1992) Phosphatase activity against neurofilament proteins from bovine spinal cord: effects of aluminium and neuropsychotropic drugs. *Neurosci. Lett.* **137**:83-7
- Shi Q and Gibson GE (2007) Oxidative stress and transcriptional regulation in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disorders.* **21**:276-91
- Shigematsu K and McGeer PL (1992) Accumulation of amyloid precursor protein in damaged neuronal processes and microglia following intracerebral administration of aluminum salts. *Brain Res.* **539**:117-23
- Shin RW, Lee VM and Trojanowski JQ (1994) Aluminum modifies the properties of Alzheimer's disease PHF tau proteins in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* **14**:7221-33
- Socorro JM, Olmo R, Teijon C, Blanco MD and Teijon JM (2000) Analysis of Aluminum-yeast hexokinase interaction: modifications on protein structure and functionality. *J. Protein Chem.* **42**:438-46
- Sorensen TL, Moller JV and Nissen P (2004) Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science.* **304**:1672-5
- Spofforth J, Edin RC and Eng MRC (1921) Case of Aluminium poisoning. *The Lancet*, **197**:1301-1921.
- Strehler EE, James P, Fischer R, Heim R, Vorherr T, Filoteo AG, Penniston JT and Carafoli E (1990) Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium pump isoforms in the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **265**:2835-42
- Sweadner KJ and Donnet C (2001) Structural similarities of Na^+, K^+ -ATPase and SERCA, the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J.* **356**:685-704
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Kisielewski Y, Jankowska A, Madziar B and Tomaszewicz M (1998) Effects of aluminum and calcium on acetyl-CoA metabolism in rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* **71**: 2447-53
- Takahashi M, Kondoy Y and Toyoshima C (2007) Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **555**:106-10
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H and Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature.* **405**:647-55
- Toyoshima C and Nomura H. (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature.* **418**:605-11
- Toyoshima C and Mizutani T (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature.* **430**:529-35
- Troncoso JC, March JL, Haner M and Aeby U (1990) Effect of aluminum and other multivalent cations on neurofilaments in vitro: an electron microscopic study. *J. Struc. Biol.* **103**:2-12.
- Tu MC, Rajwar D, Ammanath G, Alagappan P, Yildiz UH and Liedberg B (2016) Visual detection of Al^{3+} ions using conjugated copolymer ATP supramolecular complex. *Anal. Chim. Acta.* 912:105-10
- Verstraeten SV and Oteiza PI (2002) Al-mediated changes in membrane physical properties participate in the inhibition of polyphosphoinositide hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **408**:263-71
- Vogt (1986) Water quality and health: Study of possible relation between Al in drinking water and dementia. *Sosiale og Økonomiske Studier.* Oslo: Statistics Norway.61
- Wang KK, Wright LC, Machan CL, Allen BG, Conigrave AD and Roufogalis BD (1991) Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **266**:9078-85

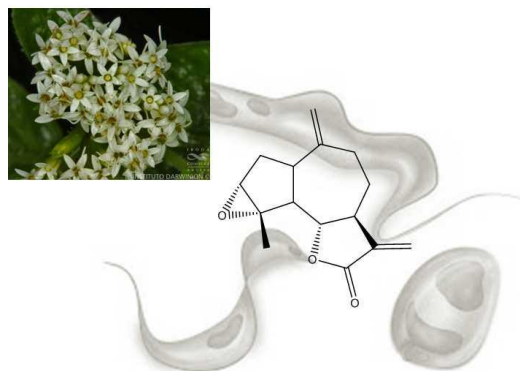
- World Health Organization (1997) *Aluminum*. Geneva: WHO. *Environmental Health Criteria*. 194
- Yu X, Carrol S, Rigoult J and Inesi G (1993) H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys. J.* **64**:1232-42
- Yumoto S, Kakimi S, Ohsaki A and Ishikawa A (2009) Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Inorg. Biochem* **103**:1579-84
- Zatta P, Ibn-Lkhatat-Idrissi M, Zam-benedetti P, Kilyen M and Kiss T (2002) In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. *Brain Res. Bull.* **59**: 41-4

ESTAFIETINA Y DERIVADOS SEMISINTÉTICOS: EVALUACIÓN DE SUS EFECTOS SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*, *LEISHMANIA SP.* Y CÉLULAS DE MELANOMA

Valeria P. Sülsen¹, Emilio Lizarraga², Silvia I. Cazorla^{3,4}, Augusto E. Bivona^{3,4}, Natacha Cerny^{3,4}, Renzo Martino³, Cesar Atilio N. Catalan²

¹Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA) (CONICET-UBA), Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina;

²Instituto de Química del Noroeste (INQUINOA-CONICET), Instituto de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.; ³Instituto de la Inmunidad Humoral (IDEHU) (CONICET-UBA), Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina; ⁴Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM) (CONICET-UBA), Facultad de Medicina, Buenos Aires, Argentina.



CONTENIDO

Resumen	108
Summary	108
Introducción	109
Materiales y métodos	111
1.- Parte química	111
1.1.- Material vegetal	111
1.2.- Aislamiento de estafietina	111
1.3.- Obtención de derivados de estafietina	112
1.3.1.- Epoxidación de estafietina	112
1.3.2.- Dehidrogenación de estafietina	112
1.3.3.- Reacción de estafietina con MnO ₂	113
1.3.4.- Reacción de estafietina con MeONa	113
1.4.- Identificación de los compuestos	113
2.- Parte biológica	113
2.1.- Parásitos	113
2.2.- Células	114
2.3.- Ensayos de actividad tripanocida	114
2.3.1.- Actividad sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	114
2.3.2.- Actividad sobre tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	114
2.3.3.- Actividad sobre amastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	114
2.4.- Ensayo de actividad leishmanicida	115
2.5.- Ensayos de citotoxicidad en células de mamífero	115
2.5.1.- Determinación de citotoxicidad en células VERO	115
2.5.2.- Determinación de citotoxicidad en cultivo p primario de esplenocitos de ratón	115
2.6.- Ensayo de proliferación sobre células de mela noma	116
2.7.- Análisis estadístico	116
Resultados	116
Parte química	116
Actividad sobre tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	118
Actividad sobre amastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	119

Actividad leishmanicida de estafietina y sus derivados	120
Citotoxicidad de estafietina y sus derivados sobrecélulas de mamífero	120
Citotoxicidad en cultivo primario de esplenocitos de ratón	121
Efecto de estafietina y sus derivados sobre células de melanoma	122
Índice de selectividad	122
Tabla 3. Valores de índices de selectividad de los compuestos 1-6	122
DISCUSION	123
Agradecimientos	126
Referencias bibliográficas	126

RESUMEN

Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos naturales que presentan numerosas actividades biológicas, entre ellas actividades antiprotozoaria y citotóxica y resultan interesantes como drogas potenciales para el futuro desarrollo de agentes terapéuticos. Estafietina es una lactona sesquiterpénica aislada de *Stevia alpina* (Asteraceae) que presenta actividad sobre las formas infectivas y no infectivas de *Trypanosoma cruzi*. Se obtuvieron derivados de este compuesto mediante transformaciones químicas realizadas sobre los grupos funcionales considerados responsables, en la mayoría de los casos, de las actividades biológicas de las lactonas sesquiterpénicas y se ensayaron los mismos sobre *T. cruzi*, *Leishmania braziliensis* y sobre células de melanoma. Los resultados obtenidos indicaron que el compuesto más activo sobre epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* fue la estafietina (IC₅₀ de 9.4, 18.7 y 2.0 µg/mL respectivamente). Con relación a la actividad frente a *L. braziliensis*, el compuesto natural, estafietina, fue el más activo con un valor de IC₅₀ de 1.0 µg/mL, seguido por los derivados dihidroestafietina (IC₅₀ de 1.3 µg/mL) y epoxiestafietina (IC₅₀=7.8 µg/mL). La estafietina y la dihidroestafietina mostraron selectividad de acción como antiprotozoarios. Frente a la línea celular de melanoma, la estafietina presentó la mayor actividad inhibitoria con un valor de CE₅₀ de 9.1 µg/mL, mientras que el derivado epoxidado presentó menor actividad (CE₅₀ = 18.1 µg/mL). La actividad antiparasitaria y citotóxica demostrada por estafietina y algunos de sus derivados, la convierten en una estructura candidato para continuar con la obtención de otros derivados semisintéticos y con futuros estudios de actividad.

Palabras claves

Derivados de estafietina; actividad antiprotozoaria; actividad citotóxica.

ESTAFIETIN AND ITS SEMISYNTHETIC DERIVATIVES: EVALUATION OF ITS EFFECTS ON *TRYPANOSOMA CRUZI*, *LEISHMANIA* SP. AND MELANOMA CELLS

SUMMARY

Sesquiterpene lactones are natural compounds with numerous biological activities, such as antiprotozoal and cytotoxic. They are considered as potential drugs for the development of new therapeutic agents. Estafietin is a sesquiterpene lactone isolated from *Stevia alpina* (Asteraceae) with activity on *Trypanosoma cruzi* infective and non -infective forms. Several derivatives have been obtained through chemical modifications introduced in the reactive groups which are supposed to be determinant of the trypanocidal activity of this class of compounds. These derivatives were assayed on *T. cruzi*, *Leishmania braziliensis* and melanoma cells. Estafietin was the most active compound on *T. cruzi* epimastigotes, tripomastigotes and amastigotes (IC₅₀ 9.4, 18.7 y 2.0 µg/mL respectively). This compound was also the more

active one on *L. braziliensis* promastigotes ($IC_{50}=1.0 \mu\text{g/mL}$), followed by dihydroestafietin ($IC_{50} = 1.3 \mu\text{g/mL}$) and epoxyestafietin ($IC_{50}=7.8 \mu\text{g/mL}$). Estafietin and dihydroestafietin showed selectivity of action as antiprotozoal. Estafietin also showed the strongest activity on the melanoma cell line with $EC_{50} = 9.1 \mu\text{g/mL}$ while epoxyestafietin presented an $EC_{50}=18.1 \mu\text{g/mL}$. The antiparasitic and cytotoxic activities demonstrated by estafietin and some of its derivatives, makes them bioactive lead molecules worth to be further investigated.

Keywords

Estafietin derivatives; antiprotozoal activity; cytotoxic activity

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias, como la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, continúan siendo un importante problema de salud pública que afecta a millones de personas particularmente en los países en desarrollo, siendo una de las principales causas de mortalidad.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, ocupa el cuarto lugar en importancia como causa de discapacidad en América Latina, constituyéndose en un problema grave de salud en el continente. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas en el mundo. Aproximadamente un 30% de los enfermos crónicos desarrollan problemas a nivel cardíaco y hasta un 10% presentan alteraciones a nivel digestivo y/o neurológico (OMS, 2016a).

La enfermedad de Chagas es la principal enfermedad endémica de importancia sanitaria en la República Argentina con alrededor de 1.5 millones de personas infectadas. Se estima que habría 7.300.000 personas expuestas y más de 300.000 afectadas por cardiopatías de origen chagásico (Ministerio de Salud, 2016a; Fernández Carral *et al.*, 2010). De acuerdo a la Iniciativa de Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi), cada semana 15 argentinos mueren a causa de la enfermedad de Chagas en nuestro país (DNDi, 2010). La enfermedad de Chagas afecta principalmente a las áreas rurales del interior del país, donde habita el vector (*Triatoma infestans*). La región más afectada es la del centro y noroeste, disminuyendo la infección hacia el sur y este del país. Las migraciones internas y externas ocurridas en los últimos años desde zonas endémicas hacia las áreas periféricas de las grandes ciudades, ha dado como resultado la “urbanización” de la enfermedad de Chagas. Debido a esta situación, en la provincia de Buenos Aires se encuentran gran cantidad de personas infectadas viviendo en zonas marginales del conurbano bonaerense (Fernández Carral *et al.*, 2010; de Rosa *et al.*, 2010).

La leishmaniasis es una parasitosis producida por protozoos del género *Leishmania*, de localización intracelular (macrófagos), caracterizada por lesiones cutáneas, mucosas o viscerales. Se estima que esta enfermedad afecta aproximadamente a 12 millones de personas en el mundo y que se producen 1.3 millones de casos nuevos por año (OMS, 2015). Esta enfermedad prevalece en los países del tercer mundo y está asociada a un bajo desarrollo urbano, deforestación, cambios climáticos y migración de poblaciones. Las especies responsables de la enfermedad en Argentina son *L. guyanensis* y *L. amazonensis* (que producen leishmaniasis cutánea); *L. braziliensis*, que es responsable de la forma cutánea y mucocutánea de la enfermedad y *L. infantum* (leishmaniasis visceral) (OMS, 2011). En nuestro país la leishmaniasis cutánea-mucosa es endémica en las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca, Santiago del Estero, Chaco, Misiones y Corrientes (Ministerio de Salud, 2016b). En 2009, el 64% de los casos de leishmaniasis cutánea correspondieron al noroeste y un 33% a la región noreste. Con relación a la leishmaniasis visceral, el 79% de los casos se notificaron en la provincia de Misiones (región noreste) (OMS, 2012). En estas regiones es frecuente encontrar pacientes coinfectados con *T. cruzi* y *Leishmania* sp. (Parodi *et al.*, 2016).

Las drogas utilizadas para el tratamiento de estas parasitosis se comercializan desde hace años y sus usos están limitados principalmente a causa de sus efectos adversos, su toxicidad, costo y resistencia emergente. Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se dispone únicamente de dos fármacos: nifurtimox y benznidazol, que fueron desarrollados en la década del '70. Estas drogas son efectivas solamente durante la etapa aguda de la enfermedad y son poco toleradas por sus severos efectos adversos. Los fármacos utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis son los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B y la pentamidina. Estas drogas presentan toxicidad principalmente a nivel renal y cardíaco y se administran únicamente por vía parenteral. En el caso de la pentamidina se requiere un uso intrahospitalario, que muchas veces lleva a discontinuar el tratamiento.

El cáncer constituye una de las más importantes causas de muerte a nivel mundial. En 2012 esta enfermedad causó 8.2 millones de defunciones y ha pasado a ser un importante problema de salud pública en los países en desarrollo, igualando el efecto que tiene en los países industrializados (OMS, 2016b). Con relación a nuestro país, se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media a alta. Los tumores malignos constituyen la principal causa de muerte entre los 40 y 64 años y la segunda entre los 5-39 años y en mayores de 64 años. Se ha estimado para nuestro país una incidencia de 217 casos nuevos por año cada 100.000 habitantes. Durante el año 2014 fallecieron 60.622 personas debido a esta enfermedad (Instituto Nacional del Cáncer, 2016).

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que deriva de una transformación maligna de los melanocitos. Es el más invasivo entre los cánceres de piel con una incidencia creciente y un mal pronóstico cuando se encuentra en la fase metastásica (tasa de supervivencia a 5 años inferior al 5%) (Chi *et al.*, 2011). La quimioterapia convencional para este tipo de cáncer incluye alcaloides derivados de la vinca, doxorubicina, cisplatino, paclitaxel, entre otros, que se administra generalmente en combinación. Sin embargo, estos fármacos han fracasado en el tratamiento del melanoma debido a las bajas tasas de respuesta y a su toxicidad (Garbe *et al.*, 2012). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas drogas sigue siendo necesaria, especialmente para la forma metastásica.

Durante los últimos años, la investigación de diferentes especies vegetales ha sentado las bases para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, ya sea como compuestos naturales *per se* o como derivados sintéticos diseñados sobre la base de los conocimientos obtenidos de un producto natural, particularmente evidente en el área de las enfermedades infecciosas y el cáncer. Muchos de los fármacos que se utilizan actualmente en la terapéutica, han tenido su origen en la naturaleza. De acuerdo a un estudio de Newman y Cragg del National Cancer Institute, el 51% de las 1355 moléculas introducidas como drogas en todo el mundo durante los años 1981-2010 fueron compuestos naturales o tienen conexión con fuentes naturales. Esto es particularmente evidente en el área de las enfermedades infecciosas y cáncer (Newman & Cragg, 2012). El descubrimiento de la quinina representa un hito en la historia de las drogas antiparasitarias de origen natural. Fue tomada como modelo para el desarrollo de antimaláricos sintéticos como quinacrina, cloroquina y mefloquina. La lactona sesquiterpénica (STL) artemisinina, aislada de *Artemisia annua* (Asteraceae) y sus derivados semisintéticos son drogas de elección utilizadas en terapias combinadas para el tratamiento de la malaria. La artemisinina, constituye un claro ejemplo de un compuesto de origen natural que proveyó una estructura líder para el desarrollo de nuevos fármacos. Este hecho determinó que exista un gran interés por la actividad antiprotozoaria de las STLs. En los últimos años, se ha demostrado que las STLs constituyen un grupo promisorio como potenciales agentes antitumorales debido a la selectividad preferencial sobre ciertos tumores y líneas celulares y por actuar sobre vías de señalización específicas. La STL arglabina aislada de *Artemisia glabella* Kar. et Kir. (Asteraceae) se encuentra aprobada como agente quimioterápico para distintos tipos de cáncer (hígado, ovarios, cuello uterino, pulmón y de mama) (Adekenov, 2016).

Las lactonas sesquiterpénicas son un grupo importante de metabolitos secundarios que han sido descritos en distintas familias: Acanthaceae, Amaranthaceae, Apiaceae, Aristolochiaceae, Asteraceae, Bombacaceae, Burseraceae, Coriariaceae, Chloranthaceae, Euphorbiaceae, Illiciaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Orchidaceae, Polygonaceae y Winteraceae. Sin embargo, las STLs son representativas de la familia Asteraceae (Padilla-Gonzalez *et al.*, 2016). Químicamente pertenecen al grupo de los terpenoides o isoprenoides y dentro de éstos a los sesquiterpenos (C₁₅). Las STLs se forman por la condensación de tres unidades de isopreno y la posterior ciclización y oxidación para formar un anillo de γ -

lactona cerrado hacia las posiciones C(5)-C(6), C(6)-C(7) o C(7)-C(8). De acuerdo a su esqueleto carbocíclico se clasifican en germacranólidos (anillo de 10 miembros), eudesmanólidos (compuestos 6/6 bicíclicos), guaianólidos y pseudoguaianólidos (compuestos 5/7 bicíclicos). La terminación "olido" indica la presencia de un grupo funcional lactona. La mayoría de las STLs contiene un anillo de γ -lactona que presenta un metileno exocíclico conjugado con el grupo carbonilo.

Estos compuestos actuarían protegiendo a las plantas contra organismos patógenos, herbívoros, insectos y mamíferos, como reguladores del crecimiento de las plantas y como agentes alelopáticos en competencia con otras plantas (Picman, 1986).

Muchas de las actividades biológicas reportadas a este tipo de compuestos se atribuyen a la presencia de del grupo α -metileno- γ -lactona. Poseen actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antiproliferativa y antiprotzoaria, entre otras (Chaturvedi, 2011; Chadwick *et al.*, 2013). Con respecto a estas dos últimas actividades se pueden citar algunos ejemplos de drogas aprobadas para su uso en terapéutica como artemisinina, aislada de *Artemisia annua*, utilizada para el tratamiento de la malaria y la STL arglabina como anticancerígena. Otras STLs que se pueden mencionar con significativa actividad antiprotzoaria y/o antiproliferativa son psilostachina, psilostachina C, cumarina, partenolido, costunolido, helenalina y tapsigargina (Sülsen *et al.*, 2008; Sülsen *et al.*, 2011, Sülsen *et al.*, 2013; Martino *et al.*, 2015; Amorim *et al.*, 2013). Estos hallazgos han determinado que se continúe con la investigación de este grupo de compuestos.

La elevada toxicidad presentada por algunas STLs determinó en sus comienzos que el interés por el estudio de este tipo de compuestos decaiga. Sin embargo, la posibilidad de introducir modificaciones estructurales en las moléculas que permitan aumentar propiedades farmacológicas (eficacia, selectividad, solubilidad), ha permitido incrementar su potencial uso terapéutico (Sass *et al.*, 2014; Adekunle, 2013). En este sentido, las modificaciones que se realicen en el anillo lactónico o en grupos funcionales de la molécula pueden contribuir al estudio de compuestos naturales con actividad tripanocida y/o citotóxica significativa.

En un estudio donde se evaluó la actividad tripanocida de 12 STLs, la estafietina, aislada de *Stevia alpina* (Asteraceae) (Heluani *et al.*, 1989), se destacó por presentar significativa actividad sobre epimatigotes de *T. cruzi* y baja toxicidad sobre células de mamífero (Fabián *et al.*, 2013).

Este resultado motivó una ampliación del estudio dedicada actividad sobre las formas infectivas e intracelulares de *T. cruzi* y sobre promastigotes *Leishmania braziliensis* y a la búsqueda de análogos con mayor actividad y/o selectividad. Asimismo, se realizó el estudio del efecto de estos compuestos sobre la viabilidad de células de melanoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Parte química

1.1.- Material vegetal

Las partes aéreas de *Stevia alpina* Griseb. (Asteraceae) fueron recolectadas el 28 de febrero de 2010 en el Km 70 de la ruta 307 en la localidad de Tafí del Valle, provincia de Tucumán, Argentina. Un ejemplar de herbario (LIL 58 5329) se depositó en el Herbario de la Fundación Miguel Lillo, S.M. de Tucumán, Tucumán, Argentina.

1.2- Aislamiento de estafietina

Para llevar a cabo el aislamiento de la STL estafietina (**1**) se procedió de acuerdo a la técnica descrita por Heluani *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Las partes aéreas de *Stevia alpina* (340 g) se extrajeron por 3min con diclorometano (3.5 L) a temperatura ambiente. La solución se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida, obteniéndose 33.5 g de residuo. El residuo se tomó con etanol 96° (300 mL). Para favorecer

la disolución se calentó a baño María a 55 °C. Una vez solubilizado el extracto se lo transfirió a una ampolla de decantación y se adicionaron 190 ml de agua (relación etanol/agua = 60:40).

Se realizó luego una partición líquido-líquido empleando n-hexano (3 x 350 mL) y cloruro de metileno (3 x 400 mL). De esta manera se obtuvieron los sub-extractos n-hexano, cloruro de metileno e hidroalcohólico respectivamente. Los extractos fueron testeados por TLC empleando como fase móvil hexano-acetato de etilo (4:1) y p-anisaldehído como revelador. Se seleccionó el subextracto diclorometano ya que concentra la mayor cantidad de estafietina (Rf: 0.27). El subextracto diclorometano obtenido se evaporó a presión reducida obteniéndose 9.72 g de residuo que se disolvieron luego con éter dietílico (25 mL) y se guardaron a 5° C por 12 h. Pasado ese tiempo, se observó la presencia de una precipitación cristalina. Se filtró por papel y se recuperaron 582 mg de “estafietina impura” y evaporado el solvente se obtuvieron 7.45 g de residuo de la fracción etérea. Este remanente fue testado por TLC empleando cloroformo: etanol (99.4:0.6) como fase móvil y el mismo revelador que en el análisis anterior. Se usó estafietina como testigo de referencia (Rf 0.22). La estafietina presente en el remanente obtenido a partir de la fracción etérea fue aislada por cromatografía en columna. Para ello 7 g de extracto fueron redissueltos con 12 mL de cloroformo y sembrados en una columna de silica-gel (180g) (70-230 mesh) empacada con cloroformo. Se empleó cloroformo: etanol (99.4:0.6) como fase móvil. Se recolectaron 58 fracciones que se reunieron de acuerdo a su perfil por TLC: fracciones 8 a 29: 0,099 g; fracciones 30-36: 0,261 g; Fracciones 37 a 54: 2,804 g; fracciones 55 a 58: 1,634 g.

Recristalización de las fracciones 37 a 54: Los 2.8 g de residuo se disolvieron con 21 mL de etanol y se le adicionó 7 mL de agua destilada, toda la mezcla se llevó a reflujo. La mezcla se filtró en caliente y se dejó reposar. Se obtuvieron cristales correspondientes a estafietina, los cuales registraron un p_f de 101-103°C. Fueron recuperados 1.2 g de estafietina. Estos cristales fueron analizados por $^1\text{H-RMN}$.

1.3.- Obtención de derivados de estafietina

1.3.1.- Epoxidación de estafietina

Estafietina (200 mg) se disolvió en 8 mL CH_2Cl_2 y 2.5 mL de 0.5M NaHCO_3 . Se enfrió a 0 °C y se añadió en pequeñas porciones cada 15 minutos, 200 mg de ácido meta-cloroperbenzoico (MCPB) (450 mg). La mezcla se agitó durante toda la noche. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC en Silicagel usando como fase móvil $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (99.3:0.7) y revelando con anisaldehído sulfúrico. Terminada la reacción, se separó la fase orgánica y se lavó con solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10% (3x3 mL), NaOH 1M (2x2mL) y H_2O (2x2 mL) y se llevó a sequedad en evaporador rotatorio. El residuo obtenido (179 mg) se cromatografió en cromatografía en columna de Silicagel (8 g, 230-400 mesh) eluída con hexano:EtOAc (1:1). Se obtuvo 46.3 mg de epoxiestafietina (**2**) (3:2 de 10 β : α isómeros).

1.3.2.-Dehidrogenación de estafietina

A estafietina (200 mg) disuelta en 7 mL MeOH , se le añadió NaBH (90₄ mg) y se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. La mezcla se acidificó gota a gota con AcH al 10% (5 mL) luego se extrajo con CHCl_3 (3x3mL). El progreso de la reacción se monitoreó por TLC en Silicagel usando como fase móvil $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (99.3:0.7) y revelando con anisaldehído sulfúrico. La fase orgánica se lavó con H_2O (1x2mL), NaHCO_3 5% (1x2mL) y H_2O (1x2mL) y se llevó a sequedad en evaporador rotatorio. El residuo (110.7 mg) fue sometido a una cromatografía en columna (Silicagel 230-400 mesh, 8 g) eluída con hexano:EtOAc (1:1), obteniéndose 105.3 mg de 11,13-dihidroestafietina (**3**).

1.3.3.- Reacción de estafietina con MnO_2

Estafietina (100 mg) se disolvió en MeOH anhidro (10 mL) y a la solución obtenida se le agregó a temperatura ambiente MnO_2 activo (550 mg) y se agitó por 30 minutos. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC en Silicagel usando como fase móvil $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (99.3:0.7) y revelando con anisaldehído sulfúrico. Se agregó CNK (20 mg) calentando y agitando por 9h. Luego la mezcla se filtró y el residuo se lavó con MeOH (2x3 mL). Los líquidos del filtrado se reunieron y se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio.

El residuo obtenido (137 mg) se tomó con CHCl_3 y la solución clorofórmica se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio y se obtuvo un producto oleoso de color amarillo (80.4 mg). Este producto se purificó por cromatografía en columna de Silicagel (230-400 mesh, 8 g) eluida con hexano:EtOAc(1:1). Se recolectaron 16 fracciones. De las fracciones 6-8 se obtuvo un compuesto gomoso incoloro (33.8 mg) (**4**) y de las fracciones 10-16 se obtuvo otro compuesto incoloro de aspecto gomoso (17.2 mg) (**5**).

1.3.4.- Reacción de estafietina con MeONa

Estafietina (100 mg) se disolvió en MeOH anhidro (5 mL). A la solución se le añadió NaOH 1N en MeOH (1 mL) y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 10 min. El progreso de la reacción se siguió por TLC de acuerdo a lo descrito anteriormente. La reacción se finalizó por medio del agregado de AcH hasta un pH de 5-6 y la mezcla obtenida se concentró bajo presión reducida (251 mg). El producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna (Silicagel 230-400 mesh, 8 g) eluida con hexano:EtOAc (1:1). Se recolectaron 8 fracciones. A partir de las fracciones 3-8 se obtuvo un compuesto puro (**6**) (66.0 mg).

1.4.- Identificación de los compuestos

Los derivados de estafietina (**2-6**) se identificaron por resonancia magnética nuclear protónica ($^1\text{H-NMR}$) y de carbono ($^{13}\text{C-NMR}$) y empleando NOESY. Cada compuesto se disolvió en CDCl_3 usando TMS como estándar interno. Los espectros de $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ fueron corridos en un equipo Bruker 300 Avance de 300 MHz. El espectro NOESY del compuesto **6** fue realizado en un equipo Bruker Avance 500.

2.- Parte biológica

2.1.- Parásitos

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* (RA) y promastigotes de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) se mantuvieron en cultivos en medio bifásico amplificándolas luego en medio LIT. Los cultivos se conservaron por pasajes semanales a 28°C y 26°C, respectivamente.

Tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* de la cepa RA y de la cepa recombinante Tulahuen que expresa β -galactosidasa (Tul- β -Gal) (Matos *et al.*, 2014) se obtuvieron a partir de ratones CF1 infectados (23.8 ± 2.6 g, 21 días de edad) por punción cardíaca en el día del pico de parasitemia (día 15 postinfección). Los tripomastigotes se mantuvieron mediante la infección de ratones CF1 de 21 días de edad.

2.2.- Células

Las células de melanoma B16F10 (ATCC) se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB), a 37°C bajo una atmósfera de 5% CO₂. Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia, se despegaron con una solución de tripsina al 0.25% (p/v)- EDTA 0.53mM, se lavaron con medio de cultivo y se llevaron a una concentración de 4x10⁵ células/mL para los ensayos.

Las células epiteliales Vero (ATCC CCL-81) fueron cultivadas bajo condiciones estándar empleando medio de cultivo DMEM complementado con 10% SFB y antibióticos.

2.3.- Ensayos de actividad tripanocida

2.3.1- Actividad sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Los epimastigotes fueron cosechados durante la fase exponencial de crecimiento y ajustados a una concentración de 1.5 x 10⁶ parásitos/mL en medio LIT suplementado con 10% de SFB descomplementado y antibióticos. Los mismos fueron cultivados por triplicado, en placas de 96 pocillos (150 µL/pocillo), en presencia de los compuestos **1-6** (0.1 – 50 µg/mL) durante 72 h. Durante las últimas 16 h se agregó 1 µCi/pocillo de ³H-Timidina. Las cpm se midieron en un contador de centelleo líquido. El porcentaje de inhibición del crecimiento frente a diferentes concentraciones de drogas fue expresado como 100-[(cpm de los parásitos en presencia de droga/cpm de los parásitos en ausencia de droga) x100]. Se utilizó Benznidazol como control positivo.

2.3.2.- Actividad sobre tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*

La actividad de los compuestos **1-6** se evaluó sobre tripomastigotes de *T. cruzi*. La sangre infectada conteniendo tripomastigotes, obtenida por punción intracardíaca, se diluyó en medio LIT ajustándolo a una concentración de 5 x 10⁵ parásitos/mL. La suspensión de parásitos se colocó en una microplaca de 96 pocillos en presencia de los compuestos (1-100 µg/mL) y se incubó a 4°C durante 24 h. El número de parásitos vivos en cada muestra se determinó en 5 µL de suspensión diluida 1/5 en buffer lisis (0.75% NH₄Cl, 0.2% Tris, pH 7.2) por conteo directo en una cámara de Neubauer. Se utilizó benznidazol como control positivo. Los cultivos se realizaron por duplicado.

2.3.3.- Actividad sobre amastigotes de *Trypanosoma cruzi*

La determinación de la actividad tripanocida de los compuestos **1-6** en el estadio intracelular de *T. cruzi* (amastigotes) fue realizada en microplacas de cultivo de 96 pocillos en las cuales se sembraron células Vero. En cada pocillo se sembraron 5x10³ células en 100 µL de medio de cultivo RPMI sin rojo fenol durante 2 h a 37°C en presencia de 5% CO₂. El medio utilizado fue complementado con 10% de SFB, 100 I.U./mL Penicilina y 100 µg/mL estreptomicina.

Las células fueron infectadas en una relación 10:1, con tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tul, la cual ha sido transfectada y expresa β-galactosidasa (Sülsen *et al.*, 2013). Luego de 24 h de cocultivo, las placas fueron lavadas con el fin de remover los parásitos que no hubieran sido internalizados y se agregaron los compuestos (0.1 a 50 µg/mL) por duplicado.

Se incluyeron además pocillos con células sin infectar (Control 0% de infección) y células infectadas, sin tratar (control 100% de infección) y tratadas con Benznidazol (Control positivo).

La placa con los distintos tratamientos se incubó durante 5 días para permitir a los parásitos replicarse y el ensayo fue revelado por la adición de 100 μ M Rojo Clorofenol β -D-galactopiranosido (CPRG) y 1% Nonidet P-40. Luego se incubaron entre 4 y 6 h a 37°C, permitiendo que en los pocillos que presentaran actividad galactosidasa cambiaran su color de amarillo a rojo. La absorbancia se determinó en un lector de placas a 595nm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). El porcentaje de inhibición (%) fue calculado como $100 - \{[\text{Absorbancia de los pocillos con células infectadas y tratadas} / \text{Absorbancia de los pocillos infectados sin tratar}] \times 100\}$.

2.4.- Ensayo de actividad leishmanicida

La actividad de los compuestos **1-6** sobre promastigotes de *L. braziliensis* se evaluó por medio del ensayo de incorporación de Timidina tritiada. Los promastigotes fueron cosechados durante la fase exponencial de crecimiento y ajustados a una concentración de 1.5×10^6 parásitos/mL en medio LIT suplementado con 10% SFB descomplementado y antibióticos. Los mismos fueron cultivados por triplicado, en placas de 96 pocillos (150 μ L/pocillo), en presencia de los compuestos (0.1 a 50 μ g/mL) durante 72 h. Durante las últimas 16 h se agregó 1 μ Ci/pocillo de ^3H -Timidina. Las cpm se midieron en un contador de centelleo líquido. El porcentaje de inhibición del crecimiento frente a diferentes concentraciones de los compuestos aislados fue expresado como $100 - [\text{cpm de los parásitos en presencia del compuesto} / \text{cpm de los parásitos en ausencia del compuesto}] \times 100$. Se utilizó anfotericina B como control positivo.

2.5.- Ensayos de citotoxicidad en células de mamífero

2.5.1.- Determinación de citotoxicidad en células VERO

La citotoxicidad de los compuestos **1-6** fue evaluada *in vitro*, empleando células Vero. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano en las cuales se sembraron 6×10^4 células /pocillo en un volumen de 150 μ L de medio RPMI sin rojo fenol. Se dejó adherir a las células durante 2 h a 37°C en atmósfera con 5% CO_2 . Luego se agregaron concentraciones crecientes de los compuestos en un rango de 12.5 a 100 μ g/mL por duplicado y se incubó por 48 h. El ensayo se reveló mediante el agregado de 1.5 mg/mL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro (MTT) durante 2 h a 37°C. Los cristales púrpura de formazan fueron disueltos empleando 150 μ L de etanol y la absorbancia medida a 570 nm en lector de microplacas. Los resultados se calcularon como la relación entre la densidad óptica en presencia y ausencia de los compuestos, multiplicado por 100.

2.5.2.- Determinación de citotoxicidad en cultivo primario de esplenocitos de ratón

Se sacrificaron ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad en cámara de CO_2 . Luego se le extrajeron los bazo en condiciones asépticas y se disgregaron mecánicamente en RPMI completo (con 10% SFB) utilizando mallas de 90 μ m de poro. La suspensión celular obtenida (esplenocitos) se centrifugó a 400 g durante 10 min a 10 °C y el pellet se resuspendió en 3 mL buffer de lisis (155 mM NH_4Cl , 17 mM Tris base, pH = 7.5) y se lo incubó 10 min a temperatura ambiente. Se agregó 7 ml de RPMI completo, se centrifugó a 400 g, 10 min a 4°C y finalmente se resuspendieron las células en medio completo y se contaron en cámara de Neubauer.

Se plaquearon 5×10^5 esplenocitos por pocillo en placa de 96 wells en RPMI completo y se los incubó por duplicado con distintas concentraciones de las drogas (5 - 200 μ g/mL) a 37 °C, 5% CO_2 durante 48 h. Luego se centrifugó la placa a 400g 10 min a 10 °C y se resuspendieron las células en PBS. Para evaluar la muerte

celular se agregó yoduro de propidio en una concentración final de 5 µg/mL y a los 5 min se pasaron las células por un citómetro de flujo. Se consideró 100% de viabilidad al control incubado sólo con el vehículo.

2.6.- Ensayo de proliferación sobre células de mela noma

El efecto de estafietina (**1**) y sus derivados (**2-6**) se evaluó sobre la proliferación de las células de melanoma B16F10 mediante el ensayo de incorporación de ³H-Timidina. Las células tumorales se incubaron por 24 h con diferentes concentraciones de los compuestos **1** a **6** (0.1 – 100 µg/mL. Durante las últimas 6 h se incorporó ³H-Timidina (20 Ci/mmol) (Martino *et al.*, 2015). Las cuentas por minuto (cpm) se midieron en un contador de centelleo líquido.

2.7.- Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media±SEM. Los valores de concentración IC₅₀ (concentración inhibitoria 50%), EC₅₀ (concentración efectiva 50%) y CC₅₀ (concentración citotóxica 50%) se calcularon por regresión lineal utilizando el programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). El análisis estadístico de los resultados de la actividad antiparasitaria y de citotoxicidad se realizó con el test de Anova, utilizando el programa GraphPad Prism 5.00. Las comparaciones se refirieron al grupo control. Valores de p<0.05 fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Parte química

A partir de *Stevia alpina* se aisló la STL estafietina (**1**). El valor de punto de fusión y los espectros de ¹H y ¹³CNMR obtenidos fueron idénticos a los reportados previamente para esta STL (Huelani *et al.*, 1989). A partir de este compuesto (**1**) se obtuvieron los derivados cuyos datos espectroscópicos se detallan a continuación:

- **Epoxiestafietina (2).** Cristales. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.63 (s) Me-15 de α y β epóxidos; 2.63 (d) H-14a+H-14b de α y β epóxidos; - 2,82 (m) H-7 de β epóxido; 3.20 (m) H-7 de α epóxido; 3.37 (s) H-3; 4.12 (dd) (11 y 9 Hz) H-6 de β epóxido; 4.14 (dd) (8.8 y 11Hz) H-6 de α-epóxido; 5.51 (d) (3.4 Hz) H-13b de β epóxido; 5.53 (d) (3 Hz) H-13b de α-epóxido; 6.23 (d) (3.6 Hz) H-13a de β-epóxido; 6.24 (d) (3.6 Hz) H-13a de α-epóxido
- **11,13-dihidroestafietina (3).** Cristales. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.59 (s) Me-15; 4.88 H-14a y 4,84 H-14b; 3.37 (s) H-3; 3.97 (dd) (10.5, 9.5) H-6; 1.22 (d) (7) Me-13; 2.92 (ddd) (10, 8, 8) H-1.
- **Compuesto (4).** Incoloro. Gomoso. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.58 (s) Me-15; 4.89 H-14a y 4,84 H-14b; 3.36 (s) H-3; 4.00 (dd) (10.4, 9.4) H-6; 3,65 (dd) H-13a+b; 2.94 (ddd) H-1; 3.36 (s) H-16 (OMe)
- **Compuesto (5).** Compuesto gomoso incoloro. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm)(s) Me-15; 4.93 H-14a y 4.88 H-14b; 3.38 (s) H-3; 4.10 (dd) (10.4, 9.4) H-6; 2.80 (dd) H-13a+b; 2.93 (ddd) H-1

- **Compuesto (6).** Blanco. Amorfo. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) H-1 2.91 (ddd) (10.4, 8.2, 7.4); H-2a 2.10 (brdd) (14.0, 7.4); H-2b 1.80 (ddd) (14.0, 10.4, 1.3); H-3 3.36 (br s); H-5 2.32 (dd) (10.7, 8.2); H-6 3.99 (dd) (10.7, 9.2); H-7 2.37 (m); H-8a 2.17 (m); H-8b 1.38 (m); H-9a 2.27 (m); H-9b 2.14 (m); H-11 2.40 (ddd) (11.7, 4.7, 3.5); H-13a 3.66 (dd) (9.8, 4.7); H-13b 3.63 (dd) (9.8, 3.5); H-14a 4.89 (br s); H-14b 4.84 (br s); H-15 1.58 (s) (3H); OCH_3 3.36 (s) (3H). ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) C-1 44.29; C-2 32.74; C-3 63.15; C-4 66.02; C-5 47.88; C-6 80.79; C-7 44.59; C-8 31.12; C-9 30.86; C-10 147.18; C-11 50.30; C-12 175.80; C-13 69.14; C-14 114.19; C-15 18.69; C-16 59.25

El espectro NOESY (500 MHz; CDCl_3) del compuesto 6 se presenta en la Fig.1.

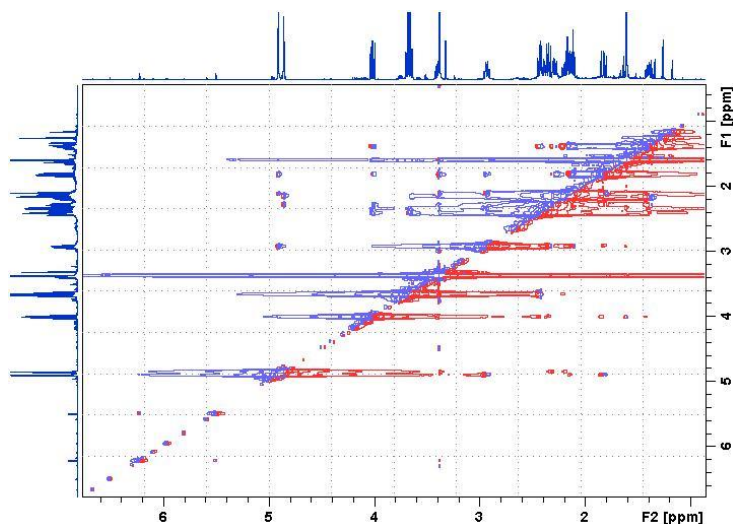


Figura 1. Espectro NOESY del compuesto 6

La asignación de las señales de los espectros de resonancia magnética nuclear permitió determinar la estructura de los compuestos y su identificación (Fig. 2).

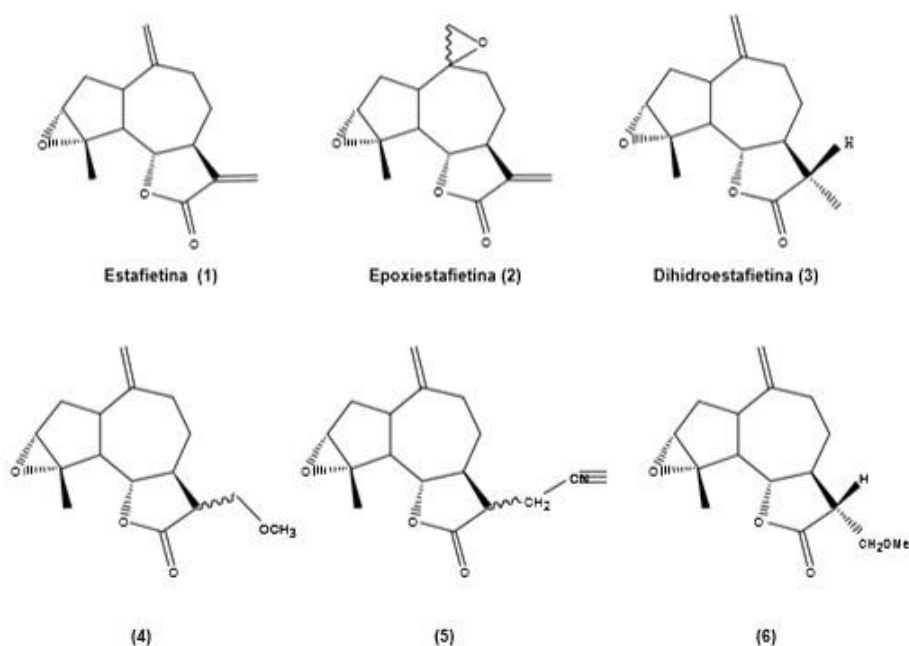


Figura 2. Estructura de estafietina (1) y de los derivados obtenidos (2-6)

Parte biológica

Actividad tripanocida de estafietina y sus derivados

- Actividad sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

A continuación se presentan los resultados de la actividad de la STL estafietina y sus derivados sobre epimastigotes de *T. cruzi*.

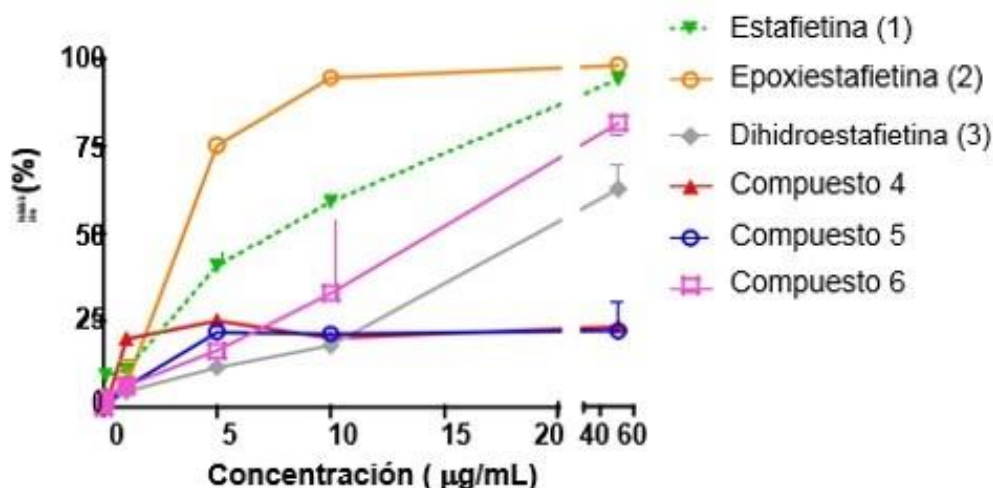


Figura 3. Efecto de estafietina y sus derivados sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* (RA). Secultivaron epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa RA en presencia de los compuesto 1-6 (0.1-50 µg/mL) durante 72 h. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados representan la media $\pm$ ESM

La epoxiestafietina fue el compuesto más activo sobre las formas no infectivas de *T. cruzi* en el rango de las concentraciones ensayadas. Esta STL presentó porcentajes de inhibición del crecimiento del 75.3 ± 3.5 %, a 5 µg/mL, siendo el valor de IC_{50} de 2.7 µg/mL. El compuesto natural, estafietina, presentó una IC_{50} de 9.4 µg/mL sobre esta forma del parásito. La dihidroestafietina (3) y el derivado 6 presentaron menor actividad (IC_{50} = 41.6 y 28.0 µg/mL), mientras que los derivados 4 y 5 fueron inactivos (IC_{50} : 136.2 y 184.8 µg/mL, respectivamente).

Actividad sobre tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Se evaluó el efecto de estafietina y sus derivados sobre tripomastigotes de *T. cruzi*.

En la Fig. 4 se presentan los efectos de los compuestos sobre las formas infectivas del parásito

El derivado epoxidado de estafietina (2) resultó ser el compuesto más activo sobre tripomastigotes de *T. cruzi* con un valor de IC_{50} de 18.7 µg/mL. El compuesto natural presentó una IC_{50} de 25.2 µg/mL. Los derivados 3 y 5 fueron menos activos (IC_{50} = 97.1 y 78.1 µg/mL), mientras que los derivados 4 y 6 resultaron inactivos frente a esta forma del parásito (IC_{50} > 100 µg/mL).

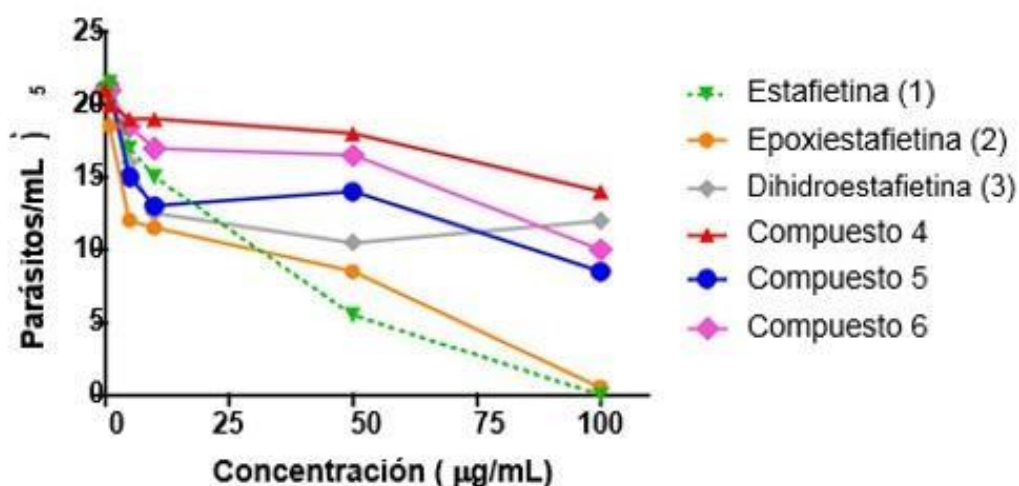


Figura 4. Efecto de los compuestos 1-6 sobre tripomastigotes de *T. cruzi* (RA). Los tripomastigotes se cultivaron en presencia de los compuestos 1-6 (1-100 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados representan la media $\pm$ ESM.

Actividad sobre amastigotes de *Trypanosoma cruzi*

La actividad de compuestos 1-6 se evaluó también sobre amastigotes de *T. cruzi*, que constituyen las formas intracelulares del parásito. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 5.

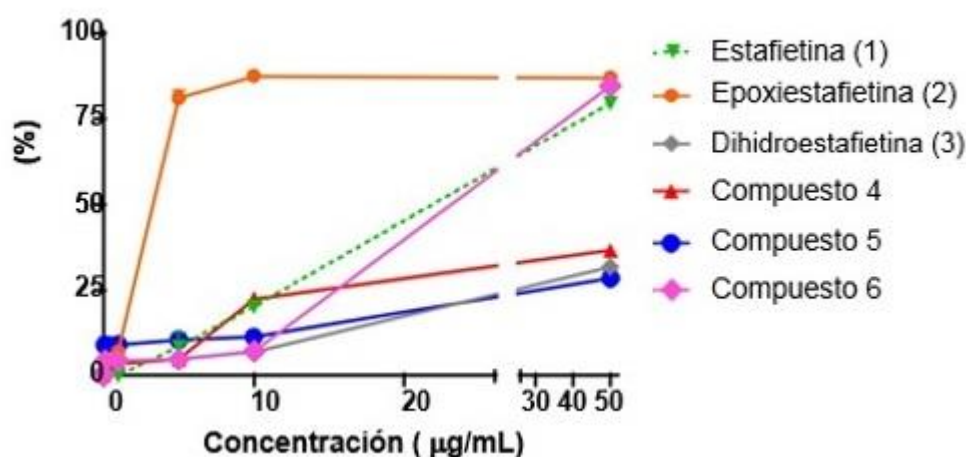


Figura 5. Efecto de los compuestos 1-6 sobre amastigotes de *T. cruzi* (RA). Los amastigotes se cultivaron en presencia de los compuestos 1-6 (0.1 - 50 $\mu\text{g/mL}$). Las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados representan la media $\pm$ ESM.

La STL epoxiestafietina (2) fue el compuesto más activo frente a la forma intracelular de *T. cruzi* con porcentajes de inhibición superiores al 75% a la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 5). Este compuesto presentó un valor de IC_{50} de 2.0 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el valor para la estafietina fue de 28.8 $\mu\text{g/mL}$. El derivado 6 presentó una actividad similar al compuesto natural (IC_{50} =30.5 $\mu\text{g/mL}$), mientras que los derivados 3-5 fueron menos activos con valores de IC_{50} de 83.0, 66.2 y 99.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Actividad leishmanicida de estafietina y sus derivados

En vista de los resultados obtenidos para *T. cruzi*, se decidió evaluar la actividad de los compuestos **1-6** sobre otro tripanosomátido: *Leishmania* sp. Se ensayó el efecto de los compuestos sobre promastigotes de *L. braziliensis*. En la Fig. 6 se presentan los resultados obtenidos.

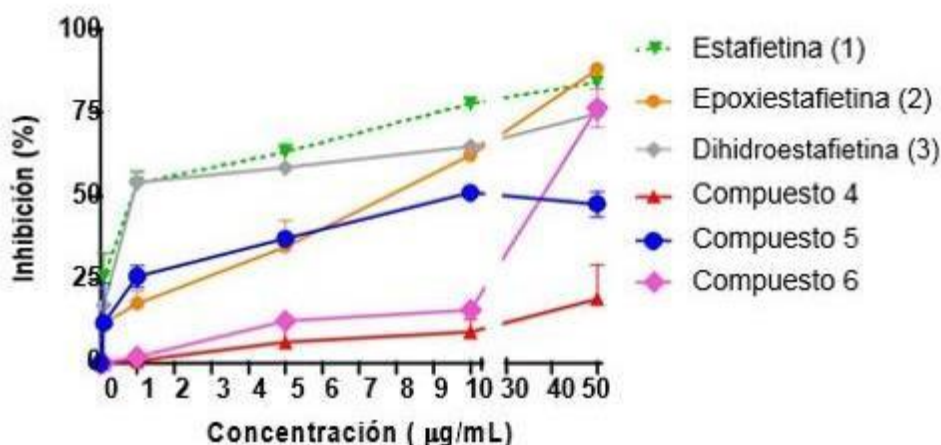


Figura 6. Efecto de estafietina y sus derivados sobre el crecimiento de promastigotes de *L. braziliensis*. Se cultivaron promastigotes de *L. braziliensis* en presencia de los compuestos 1-6 (0.1 -50 µg/mL) durante 72 h. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados representan la media ± ESM.

Las STLs estafietina y dihidroestafietina fueron los compuestos más activos frente a promastigotes de *L. braziliensis* con valores de IC₅₀ de 1.0 y 1.3 µg/mL, respectivamente. La epoxiestafietina (**2**) presentó menor actividad frente a este parásito (IC₅₀=7.8 µg/mL). Los derivados **5** y **6** presentaron valores de IC₅₀ de 48.7 y 51.8 µg/mL, respectivamente. El derivado **6** fue inactivo (IC₅₀> 100 µg/mL).

Citotoxicidad de estafietina y sus derivados sobre células de mamífero

- Citotoxicidad en células VERO

Los resultados del efecto de los compuestos sobre células Vero se muestran en la Fig.7.

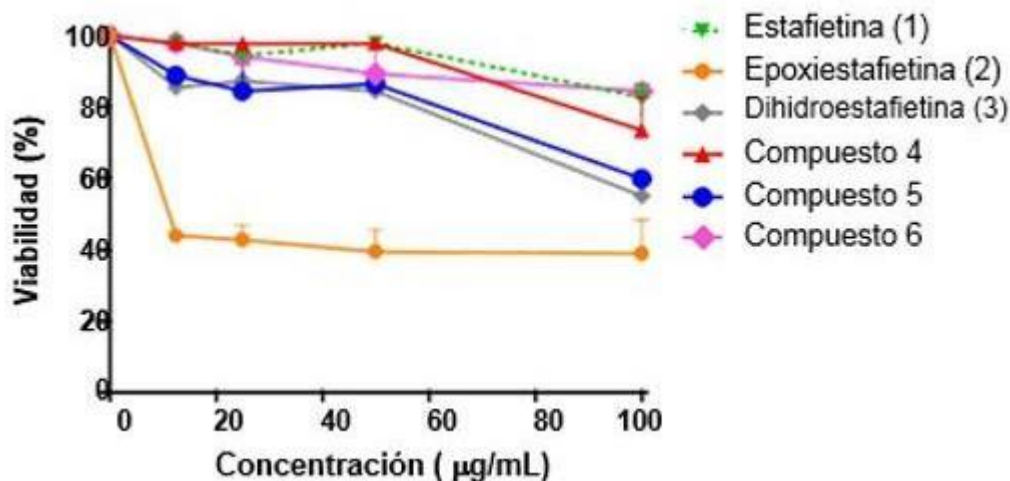


Figura 7. Efecto de estafietina y sus derivados sobre la viabilidad de células VERO

La STL estafietina y sus derivados, con excepción del derivado epoxidado (**2**), mostraron baja toxicidad sobre células Vero. A la mayor concentración ensayada, los compuestos presentaron una viabilidad celular superior al 60%. En la tabla 1 se presentan los valores de CC₅₀ de estafietina y sus derivados.

Tabla 1. Valores de concentración citotóxica 50 (CC₅₀) de los compuestos 1-6 en células Vero

Compuestos	CC ₅₀ (µg/m L)
Estafietina (1)	311.4
Epoxiestafietina (2)	8.1
Dihidroestafietina (3)	164.6
Compuesto 4	200.9
Compuesto 5	133.6
Compuesto 6	315.6

Estafietina y el derivado **6** fueron los compuestos que mostraron menor toxicidad sobre células Vero con valores de CC₅₀ de 311.4 y 315. 6 µg/mL respectivamente.

Citotoxicidad en cultivo primario de esplenocitos de ratón

La citotoxicidad de la STL estafietina y sus derivados se evaluó también sobre cultivo primario de esplenocitos de ratón. Se calcularon las concentraciones que produjeron un 50% de citotoxicidad (CC₅₀) (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de concentración citotóxica 50 (CC₅₀) de los compuestos 1-6 en esplenocitos de ratón

Compuestos	CC ₅₀ (µg/m L)
Estafietina (1)	5.5
Epoxiestafietina (2)	4.2
Dihidroestafietina (3)	54.8
Compuesto 4	151.5
Compuesto 5	147.7
Compuesto 6	53.5

Los compuestos **1** y **2** presentaron valores de CC₅₀ de 5.5 y 4.2 µg/mL respectivamente. Los compuestos **3** y **6** presentaron menor citotoxicidad (CC₅₀=54.8 y 53.5 µg/mL), mientras que para los compuestos **4** y **5** las CC₅₀ obtenidas fueron mayores a 100 µg/mL.

Efecto de estafietina y sus derivados sobre células de melanoma

También se evaluó el efecto de la STL estafietina y de los derivados sintetizados sobre células de melanoma. En la Tabla 2 se presentan los valores de EC₅₀ obtenidos para cada compuesto.

Tabla 2. Valores de concentración efectiva 50% (EC₅₀) de los compuestos 1-6 sobre células de melanoma B16F10

Compuestos	EC ₅₀ (µg/mL)
Estafietina (1)	9.1
Epoxiestafietina (2)	18.1
Dihidroestafietina (3)	> 50
Compuesto 4	> 50
Compuesto 5	> 50
Compuesto 6	> 50

El compuesto natural estafietina y su derivado epoxidado mostraron actividad in vitro frente a células de melanoma con valores de EC₅₀ de 9.1 y 18.1 µg/mL respectivamente. Los derivados 3-6 fueron inactivos frente a esta línea celular tumoral (EC₅₀s > 50 µg/mL).

Índice de selectividad

Se determinó el índice de selectividad (SI) de los compuestos **1-6** a través de la relación de los valores de citotoxicidad en células de mamífero y los valores de actividad sobre los parásitos y sobre células de melanoma. Los valores de SI para cada compuesto se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de índices de selectividad de los compuestos 1-6

Compuestos	Tripes	Amas	Promas	Células melanoma
Estafietina (1)	12.3	10.8	311.4	0.6
Epoxiestafietina (2)	0.4	4.0	1.0	0.2
Dihidroestafietina (3)	1.7	2.0	126.6	> 1.1
Compuesto 4	1.0	3.0	1.5	> 3.0
Compuesto 5	1.7	1.3	2.7	> 2.95
Compuesto 6	3.1	10.3	6.1	> 1.1

La STL estafietina presentó cierta selectividad de acción sobre las formas infectivas e intracelulares de *T. cruzi* con SI de 12.3 y 10.8. De los derivados obtenidos, el compuesto **6** mostró selectividad de acción frente a amastigotes de *T. cruzi*. Estafietina y dihidroestafietina fueron selectivos frente a promastigotes de *L. braziliensis* (SI de 311.4 y 126.6, respectivamente). Ninguno de los derivados fue selectivo frente a células de melanoma.

DISCUSION

Los productos naturales cumplen un papel importante en los procesos de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. La gran diversidad química que presentan, determina que exista una mayor posibilidad de encontrar nuevas moléculas con estructuras únicas y con potenciales actividades biológicas. Así mismo, otro de los argumentos que justifican la exploración de los productos naturales en la búsqueda de nuevas drogas es que los compuestos de origen natural presentan estructuras únicas y diferencias en la arquitectura molecular comparada con los productos de síntesis.

Estas moléculas pueden ser optimizadas (por procedimientos de síntesis total o parcial) ya sea en términos de eficacia y selectividad o para lograr óptimas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Como ejemplos se pueden citar a la morfina, quinina, artemisinina, drogas utilizadas en la actualidad y a partir de la cual se han desarrollado derivados semisintéticos y sintéticos basados en el mismo farmacóforo (Newman & Cragg, 2012; Ganesan, 2008).

A partir de los compuestos naturales bioactivos se pueden obtener derivados con el objetivo de mejorar su actividad, ampliar su espectro de acción o mejorar su biodisponibilidad. Tal es el caso de la STL artemisinina que presentaba limitada estabilidad y baja solubilidad en agua y en aceite, medios utilizados para la administración parenteral. Con el objetivo de solucionar estos inconvenientes, se sintetizaron derivados como la dihidroartemisinina, artemeter (éter metílico), arteeter (éter etílico) y artesunato (hemisuccinato).

Las STLs son compuestos terpenoides naturales de gran diversidad estructural característicos de la familia Asteraceae. De acuerdo a diferentes autores, estos compuestos pueden ser considerados como drogas potenciales con un alto impacto en el futuro desarrollo de agentes terapéuticos (Wang *et al.*, 2005; Chadwick *et al.*, 2013; Chaturvedi, 2011).

Existen en la bibliografía referencias sobre la actividad antiparasitaria de diferentes lactonas sesquiterpénicas: partenólido con actividad tripanocida sobre epimastigotes de *T. cruzi* con un valor de IC₅₀ de 0.5 µg/mL (Izumi *et al.*, 2008); dehidroleucodina (Breggio *et al.*, 2000) 57); la helenanina y mexicanina activas sobre las formas no infectivas de *T. cruzi* con valores de IC₅₀ de 1.9 y 3.8 mM (Jimenez-Ortiz *et al.*, 2005) y de 0.69 mM y 1.87 mM sobre tripomastigotes de *T. cruzi*, respectivamente (Schmidt *et al.*, 2002). Helenalina, mexicanina y dehidroleucodina también fueron activos frente a promastigotes de *L. mexicana* (IC₅₀ entre 1.9-3.8 mM) (Barrera *et al.*, 2008). Otro ejemplo es el partenólido, activo sobre *L. amazonensis* con un valor de IC₅₀ de 0.37 µg/mL. (Tiuman *et al.*, 2005).

También se encuentran en la literatura antecedentes de STLs con significativa actividad frente a distintas células neoplásicas. Diversas STLs como artemisinina, tapsigargina, partenolido y derivados sintéticos se encuentran en ensayos clínicos (Ghantous *et al.*, 2010). Las STLs psilostachina, psilostachina C, peruvina y cumanina fueron activas sobre células de linfoma murino (línea celular BW5147). Psilostachina C fue activa y selectiva frente a células de linfoma (EC₅₀= 4.89 µg/mL y SI>10). Esta STL indujo apoptosis, alteración del potencial de membrana mitocondrial y produjo arresto del ciclo celular en la fase S (Martino *et al.*, 2015). Otras STLs que se pueden mencionar son costunolido y dehidrocostus lactona, que fueron activas frente a líneas de sarcoma (SW-872, SW-982 and TE-671) inhibiendo la proliferación celular en forma dosis-dependiente (Lohberger *et al.*, 2013).

En investigaciones previas donde se evaluó la actividad tripanocida de un conjunto de STLs, la estafietina se destacó por ser una de las STLs que inhibió el crecimiento de *T. cruzi* sin afectara las células de mamíferos. Teniendo en cuenta estos resultados y los antecedentes de actividad de diversos derivados de STLs, se encaró la síntesis de derivados de estafietina y se decidió ampliar el estudio de este compuesto y sus análogos sobre los estadios infectivo e intracelular de *T. cruzi*, así como su evaluación sobre otro protozoo como *L. braziliensis*, responsable de casos de leishmaniasis en nuestro país y sus efectos sobre células tumorales.

La estrategia utilizada para la obtención de derivados de estafietina fue realizar modificaciones sobre las funcionalizaciones más frecuentes de las STLs. En este sentido y teniendo en cuenta la reactividad de los grupos epóxidos, se decidió preparar el derivado epoxidado de estafietina. Para ello se utilizó ácido meta-

cloroperbenzoico (m-CPBA). La presencia de dobles enlaces en las posiciones 1,10 y 4,5 es muy frecuente en las STL. Cuando ambos dobles enlaces están presentes en una molécula de germacranolido lactonizado 7,6 la epoxidación con m-CPBA produce generalmente 1,10-epóxidos. El uso de exceso de reactivo permite obtener el 1,10;4,5-diepoxiderivado. En el caso de estafietina, se generaron dos epóxidos esteroisómeros según el reactivo ataque por el lado α o por el lado β de la molécula para dar una mezcla del 10 β ,14-epóxido- y 10 α ,14-epóxido en relación 3:2 (Heluani *et al.*, 1989).

Debido a que las STL poseen típicamente un grupo α -metileno- γ -lactona con el doble enlace exocíclico ubicado entre C-11 y C-13, este doble enlace puede ser reducido selectivamente por hidrogenación empleando paladio al 5% sobre Carbón o con borohidruro de sodio en metanol para producir el 11,13-dihidroderivado. La comparación de actividad entre las STLs de partida y su 11,13-dihidroderivado da información útil sobre la relevancia de la porción α -metileno- γ -lactona en la bioactividad y sobre el mecanismo de acción operativo. La saturación del doble enlace 11,13 exocíclico de las STLs podría hacer desaparecer ó reducir significativamente la actividad cuando esta sea debida a una adición tipo Michael (adición 1,4) de grupos -SH (sulfidrilo) de proteínas. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se decidió preparar el 11,13-dihidroderivado de estafietina.

Para evaluar la influencia del anillo γ -lactona en la actividad, se practicaron reacciones tendientes a lograr la apertura de este anillo. En este sentido, se realizó una reacción de alcoholisis (metanólisis) empleando metanol anhidro y un catalizador ácido para obtener el correspondiente hidroxíéster α,β -insaturado. Luego de practicar la reacción de estafietina con MeOH anhidro y MnO₂ activo y de analizar los espectros ¹H-RMN se logró identificar los dos compuestos obtenidos: un compuesto menos polar que se obtuvo por una adición tipo Michael al doble enlace (compuesto **4**) y un compuesto más polar resultante de la adición de CN al doble enlace (compuesto **5**). Por lo tanto, a través de esta reacción no se logró la apertura del anillo lactónico. Teniendo en cuenta estos resultados, se practicó sobre estafietina otra reacción para abrir dicho anillo lactónico. Para ello se trató a la STL con metóxido de sodio en MeOH. Luego de practicada la reacción se obtuvo un único compuesto (compuesto **6**), producto de adición al doble enlace 11,13-exocíclico de la estafietina (aducto tipo Michael) del metanol. Como productos de reacción se esperaba obtener el hidroxíéster α,β -insaturado de estafietina y el producto por adición tipo Michael al doble enlace. Formalmente, se pueden obtener dos diastereoisómeros según el grupo -CH₂OMe quede con estereoquímica α o β .

Los datos de RMN indican que solo se formó el diastereoisómero con estereoquímica α del grupo 13-CH₂OMe. Esto fue deducido por el elevado valor de la constante de acoplamiento entre H-7 y H-11 ($J = 11.7$ Hz), sugiriendo una disposición trans entre ambos. Se sabe que el hidrógeno H-7 tiene configuración α en todas las lactonas sesquiterpénicas de la familia Asteraceae, y por ello se deduce que H-11 debe tener estereoquímica β para que se encuentre en posición trans respecto de H-7. Además, el valor experimental del acoplamiento entre H-7 y H-11 (11.7 Hz) está en concordancia con el valor que se calcula por modelado molecular para la lactona con el grupo -CH₂MeOMe en posición α que es de 11.25 Hz.

Esta deducción fue confirmada experimentalmente por los resultados del espectro NOESY. En este espectro se puede ver claramente un "crosspeak" entre H-6 β (3.99 ppm) con H-11 (2.40 ppm) que indica que deben estar sobre el mismo lado de la molécula. Se puede apreciar también el "crosspeak" entre los protones 13a,b (3.63 y 3.66 ppm) con H-7 α (2.37 ppm). De esta manera se asigna estereoquímica β para H-11 y en consecuencia el -CH₂OMe debe ser α .

La estafietina y sus derivados fueron ensayados sobre epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* y sobre promastigotes de *L. braziliensis*. El derivado epoxidado de estafietina resultó más activo sobre epimastigotes (IC₅₀= 2.7 μ g/mL) que el compuesto natural (IC₅₀= 9.4 μ g/mL), que indicaría que la introducción de un grupo epóxido adicional en la molécula contribuiría con la actividad tripanocida.

Los derivados que presentaban saturación del doble enlace exocíclico demostraron menor actividad (compuestos **3** y **6**) o fueron inactivos (compuestos **4** y **5**). Resultados similares se obtuvieron cuando los compuestos fueron evaluados sobre las formas infectivas del parásito: la epoxiestafietina (**2**) fue el derivado que presentó mayor actividad sobre tripomastigotes de *T. cruzi* con un valor de IC₅₀ de 18.7 µg/mL. La STL estafietina presentó un valor de IC₅₀ de 25.2 µg/mL. Los demás derivados resultaron menos activos o inactivos. Al ser evaluados sobre amastigotes, epoxiestafietina presentó la mayor actividad tripanocida, siendo su valor de IC₅₀ un orden de magnitud menor que el compuesto natural (IC₅₀ de 2.0 vs 28.8 µg/mL). El derivado **6** (diastereoisómero con estereoquímica α-CH₂OMe) presentó una actividad comparable a la del compuesto natural sobre el estadio intracelular de *T. cruzi*. Con relación a la actividad antileishmánica, se observó un comportamiento diferente: estafietina fue la STL más activa frente a *L. braziliensis* con un valor de IC₅₀ de 1.0 µg/mL. De los derivados obtenidos, la dihidroestafietina fue la que presentó mayor actividad frente a este parásito con un valor de IC₅₀ de 1.3 µg/mL, seguida de epoxiestafietina (IC₅₀=7.8 µg/mL).

Con el objetivo de evaluar si la STL estafietina y sus derivados presentaban actividad sobre células tumorales, se los ensayó sobre células de melanoma. El compuesto natural estafietina fue el más activo frente a la línea celular B16F10 con un valor de EC₅₀ de 9.1 µg/mL. El derivado epoxidado presentó menor actividad (IC₅₀ = 7.8 µg/mL), mientras que los compuestos **4-6** resultaron inactivos.

La mayoría de las STLs contienen un anillo del γ-lactona con un grupo metileno exocíclico conjugado con el grupo carbonilo. Muchas de las actividades biológicas de las STLs son atribuidas a la presencia de este grupo. La eliminación del grupo carbonilo α,β insaturado en este tipo de compuestos determinaría una pérdida de la actividad biológica observada, indicando que estos compuestos se unirían covalentemente a las proteínas blanco a través de una adición de Michael (Csupor-Löffler *et al.*, 2009). La alquilación de grupos SH de las células afectaría determinados procesos biológicos que llevarían a la muerte celular (Gach & Janecka, 2014). Del conjunto de resultados obtenidos de la actividad tripanocida y citotóxica de estafietina y sus derivados, se puede señalar que aquellos compuestos que perdieron el doble enlace exocíclico, evidenciaron una disminución o pérdida de la actividad, que se relaciona con las observaciones realizadas por diversos autores para este tipo de compuestos (Schmidt *et al.*, 2002). Sin embargo, en algunos casos los compuestos no pierden actividad aun teniendo el grupo exometileno exocíclico reducido como ocurre en el caso de la artemisinina, matricina y santonina o es endocíclico como glaucólidos e hirsutinólidos, (Padilla Gonzalez *et al.*, 2016). Esta situación se evidenció para la actividad antileishmánica, donde la dihidroestafietina presentó un valor similar a la del compuesto natural.

El metileno exocíclico conjugado con el carbonilo y los grupos carbonilos α,β-insaturados adicionales, son los elementos necesarios para crear una entidad electrofílica capaz de involucrarse en una adición de Michael con nucleófilos como los grupos SH. Otras características estructurales de este tipo de compuestos como grupos epoxi, aldehídos o peroxi parecen también ser responsables en algunos casos de la actividad. En este sentido, la incorporación de un grupo epóxido adicional a la estafietina produjo en líneas generales un aumento de la actividad antiparasitaria, no así de su actividad antiproliferativa sobre células de melanoma.

Un aspecto relevante en la búsqueda de moléculas bioactivas es la determinación de la selectividad de acción. Para ello, es necesario determinar si los compuestos son tóxicos sobre las células de huésped. El índice de selectividad (SI) relaciona la toxicidad entre las células de mamífero y la actividad sobre los protozoos y/o células tumorales. Este índice se define como el cociente entre la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) y la 50 concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) o la concentración efectiva 50% (EC₅₀). Un valor de SI mayor a 1 indica que el compuesto es más selectivo sobre los parásitos y/o células tumorales que sobre células normales. Teniendo en cuenta estas premisas se realizaron ensayos con células Vero y en un cultivo primario utilizando esplenocitos de ratón.

Cuando se desea calcular el índice de selectividad de una droga con actividad tripanocida es importante realizar el ensayo de citotoxicidad en la misma línea celular que se utiliza para evaluar el efecto frente a amastigotes. Debido a esto, utilizamos células Vero en uno de los ensayos de citotoxicidad. Los resultados obtenidos demostraron que estafietina fue el compuesto más selectivo frente a *T. cruzi*. El derivado epoxidado presentó cierta selectividad frente a la forma intracelular de este parásito. La STLs estafietina y la

dihidroestafietina fueron selectivas frente a promastigotes de *L. brazileinsis* (considerando la citotoxicidad en células Vero). Se decidió evaluar también los efectos de estafietina y sus derivados en un cultivo primario. Este ensayo se realizó con el objeto de evaluar la selectividad de acción de los compuestos por células neoplásicas, ya que es más correcto comparar los resultados frente a un cultivo primario que frente a una línea celular. Ninguno de los compuestos evaluados mostró selectividad de acción frente a células de melanoma considerando para el cálculo de los SI los valores de CC₅₀ en esplenocitos de ratón. Dado el conjunto de los resultados obtenidos se puede señalar que muchas veces los grupos introducidos en la molécula, si bien aumentan la actividad también influyen en la citotoxicidad y por ende en la selectividad de acción de los compuestos, como ocurrió con la epoxiestafietina.

La búsqueda de nuevos fármacos comprende un proceso con una serie de etapas donde la detección de moléculas activas y selectivas resulta indispensable. La obtención de derivados semisintéticos constituye una estrategia para la optimización de moléculas activas. Tal es el caso de la tapsigargina, una STL aislada de *Thapsia garganica*, con actividad secretagoga de histamina e inhibidora de mediadores de la respuesta inflamatoria y citotóxica. A partir de tapsigargina se han sintetizado numerosos análogos (alrededor de 110) y se ha desarrollado con uno de ellos una prodroga: mipsagargina que se emplea en los tumores neovasculares y que se encuentra en fase clínica II en pacientes con cáncer prostático y hepatocarcinoma (Quynh Doan & Christen sen, 2015).

Características como la lipofilia, presencia de grupos aceptores de Michael y ciertas características estéricas y electrónicas determinan que las STLs sean consideradas estructuras privilegiadas que pueden ser tomadas como punto de partida para la búsqueda de nuevos fármacos. La actividad antiparasitaria de mostrada por la STL estafietina y algunos de sus derivados, sumada a estas características la convierten en una estructura candidato para la obtención de otros derivados semisintéticos y futuros estudios de actividades biológicas. Nuestro grupo de trabajo se encuentra abocado a obtención de otros derivados de estafietina y de otras STLs con el objetivo de poder detectar compuestos activos y selectivos, capaces de convertirse en futuros fármacos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el CONICET (PIP 0324 y 0225) y la Universidad de Buenos Aires (UBACYT 20020130200270).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adekenov S. M. (2013) Natural sesquiterpene lactones as renewable chemical materials for new medicinal products. *Eurasian Chemico-Technological Journal* **15**:163-174.
- Adekenov S. M. (2016) Chemical modification of arglabin and biological activity of its new derivatives. *Fitoterapia* **110**: 196–205.
- Amorim M.H., R.M. Gil da Costa, C. Lopes, M.M. Bastos (2013) Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. *Crit. Rev.Toxicol.* **43**: 559-79.
- Barrera P., V. Jimenez-Ortiz, C. Tonn, O. Giordano, N. Galanti y M. Sosa (2008) Natural sesquiterpene lactones are active against *Leishmania Mexicana*. *Journal of Parasitology* **94**:1143-49.
- Bregio S., S. Belmonte, E. Guerreiro, O. Giordano, E. Pietrobon, M. Sosa (2000)*Journal of Parasitology* **86**:407-12.
- Csupor-Löffler, B., Z. Hajdú, I. Zupkó, B. Réthy, G. Falkay, P. Forgo, et al. (2009) Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium*.I. on cultured human tumor cell lines. *Phytother. Res.* **23**: 672–76.

- Chadwick M., H. Trewin, F. Gawthrop, C. Wagstaff (2013) Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 12780-805.
- Chaturvedi D. (2011) "*Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities*," en "Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry" (V. Tiwari, B. Mishra, Eds.), Research Signpost, Kerala, India, pp. 313–34.
- Chi Z. H., S. M. Li, X.N. Sheng, L. Si, C.L. Cui, M. Han, et al. (2011) Clinical presentation, histology, and prognoses of malignant melanoma in ethnic Chinese: a study of 522 consecutive cases. *BMC Cancer* **11**:10.
- De Rosa M., S. Auger & R.A.Storino (2010) "*Cardiopatía chagásica: métodos de diagnóstico y tratamiento*" , en "Chagas en el siglo XXI. De la enfermedad a la problemática social" (Storino R. A. ed.), Akadia, Buenos Aires, pp. 137-151.
- DNDi newsletter. "*Argentina: more action needed*" Nº19, March 2010, Pag. 5.
- Fabian L., V. Sülsen V., F. Frank, S. Cazorla, E. M alchiodi, V. Martino et al. (2013) In silico study of structural and geometrical requirements of natural sesquiterpene lactones with trypanocidal activity. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **13**:1407-14.
- Fernández Carral S., A. Aragües, A. Jait., A. Ochoa , N. Perez, E. Rios et al. (2010) "*Viejos problemas, nuevas alternativas: un abordaje desde una gestión pública*", en "Chagas en el siglo XXI. De la enfermedad a la problemática social" (Storino R. A. ed.), Akadia, Buenos Aires, pp. 247-59.
- Gach K. & A. Janecka (2014) Methylene-c-lactones as a novel class of anti-leukemic agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **14**: 688–94.
- Ganesan A., (2008) The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**:306-17.
- Garbe C., K. Peris, A. Hauschild, P. Saiag, M. Middleton, A. Spatz et al. (2012) Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline—Update. *Eur. J. Cancer* **48**: 2375–90.
- Ghantous, A., H. Gali-Muhtasib, H. Vuorela, N.A. Saliba, Darwiche, N.(2010) What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov.Today* **15**: 668–78.
- Heluani C.S., M. P. de Lampasona, C.A.N. Catalán, V . L. Goedken, A.B. Gutiérrez, W. Herz (1989) Guaianolides, heliangolides and other constituents from *Stevia alpina*. *Phytochemistry* **28**:1931–35.
- Instituto Nacional del Cáncer (INC), 2016. Estadísticas. "*Análisis de la situación del cáncer en Argentina*" Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>. Accedido 29 de agosto de 2016.
- Izumi E., L. Morello, T. Ueda-Nakamura, S. Yamada-Ogatta, B. Filho, D. Cortez et al. (2008) *Trypanosoma cruzi*: antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Experimental Parasitology* **118**: 324-30.
- Jimenez-Ortiz V., S. Brengio, O. Giordano, C. Tonn, M. Sanchez, M. Burgos et al. (2005) The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes. *Journal of Parasitology* **91**:170-74.
- Lohberger, B., B.Rinner, N. Stuehl, H. Kaltenegger, B. Steinecker-Frohnwieser, E. Bernhart et al. (2013) Sesquiterpene lactones downregulate G2/M cell cycle regulator proteins and affect the invasive potential of human soft tissue sarcoma cells. *PLoS One* **8**: 1– 9.
- Martino R., M. F.Beer, O. Elso, O. Donadel, V. Sülsen, C. Anesini (2015) Sesquiterpene lactones from *Ambrosia* spp. are active against a murine lymphoma cell line by inducing apoptosis and cell cycle arrest. *Toxicology in Vitro* **29**: 1529–36.
- Matos M.N., S.I. Cazorla, A.E.Bivona, C. Morales, C.A.Guzmán, E.L.Malchiodi (2014) Tc52 amino-terminal-domain DNA carried by attenuated *Salmonella enteric* serovar Typhimurium induces protection against a *Trypanosoma cruzi* lethal challenge. *Infect Immun.* **82**:4265-75. doi: 10.1128/IAI.02190-14. Epub 2014 Jul 28.
- Ministerio de Salud, 2016 a. Programa Nacional de Chagas. "*El Chagas en el país y América Latina*". Disponible en:<http://www.msal.gov.ar/chagas/index.php/informacion-para-ciudadanos/el-chagas-en-el-pais-y-america-latina>. Accedido en agosto de 2015.
- Ministerio de Salud, 2016 b. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/observatorio/images/stories/documentos_institucional/materiales-didacticos/2-3-3-H-moduloleishmaniasis.pdf. Accedido 29 de agosto de 2016.

- Newman D. & G. Cragg (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* **75**:311-35.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2016a. “*La Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)*”. Nota Descriptiva N°340. Marzo 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>. Accedido 29 de agosto de 2016.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016b. *Cáncer. Datos y cifras sobre el cáncer*. Disponible en:<http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>. Accedido 29 de agosto de 2016.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2015. “*Leishmaniasis*”. Nota Descriptiva N°375. Febrero 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>. Accedido 15 de marzo de 2015.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2012. *Salud en las Américas. Volúmenes de Países*.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2011. “WHO Technical Report Series on the control of the leishmaniasis” - TRS N°949.
- Padilla-Gonzalez G. F., F. Antunes dos Santos & F. Batista Da Costa (2016) Sesquiterpene lactones: more than protective plant compounds with high toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences* **35**:18-37.
- Parodi C., M.F. García Bustos, F. Ramos, A.G. González Prieto, M.C. Mora , P. Baré et al. (2016) American tegumentary leishmaniasis: T-cell differentiation profile of cutaneous and mucosal forms-co-infection with *Trypanosoma cruzi*. *Med. Microbiol. Immunol.* **205**: 353-69. doi: 10.1007/s00430-016-0455-0. Epub 2016 Apr 4.
- Picman A. K. (1986) Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology* **14**: 255-81.
- Quynh Doan N.T & S.B. Christensen (2015) Thapsigargin, origin, chemistry, structure-activity relationships and prodrug development. *Curr.Pharm. Des.* **38**: 5501-17.
- Sass D. C., G. Oliveira Morais, R. A. Crema Miranda, L. Guidi Magalhães, W. R. Cunha, R. Alves dos Santos et al. (2014) Structurally modified natural sesquiterpene lactones constitute effective and less toxic schistosomicidal compounds. *Org. Biomol. Chem.* **12**: 7957-64.
- Schmidt T., R. Brun, G. Willuhn & S. Khalid (2002) Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. *Planta Medica* **68**:750-1.
- Sülsen V., F. Frank, S. Cazorla, C. Anesini, E. Malchiodi, B. Freixa et al. (2008) Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 2415-19.
- Sülsen V., F. Frank, S. Cazorla, P. Barrera, B. Freixa, R. Vila et al. (2011) Psilostachyin C: a natural compound with trypanocidal activity. *International Journal of Antimicrobial Agents* **37**: 536-43.
- Sülsen V., S. Cazorla, F. Frank, L. Laurella, L. Muschietti, C. Catalan et al.(2013) Natural terpenoids from *Ambrosia* species are active in vitro and in vivo against human pathogenic trypanosomatids. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**: e2494 1-10.
- Tiuman T., T. Ueda-Nakamura, D. García Cortez, B. Dias Filho, J. Morgado-Díaz, W. de Souza et al. (2005) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**:176-182.
- Wang G., W. Tang & R. Bidigare (2005) “*Terpenoids As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents*”, en “Natural products drug discovery and therapeutic medicine” (Zhang L. & Demain A. ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey, Chapter 9, pp. 197-227.

ESTUDIO DE UNIÓN DE UN LIGANDO CON PROPIEDADES ALLOSTÉRICAS PARA EL RECEPTOR NICOTÍNICO

Carlos Humberto Paván*

*LANAIS PROEM- UBA-CONICET. Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas Prof. Alejandro Paladini (IQUIFIB). Junín 956. CP C1113AAD. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Email: cpavan@qb.ffyb.uba.ar

Tabla de contenidos

Resumen	129
Summary	130
Introducción	130
El receptor nicotínico a acetilcolina	130
Subtipos	130
Estructura espacial del receptor nicotínico a acetilcolina	131
Sitio de unión ortostérico	131
Estructura secundaria	132
Estados conformacionales del receptor nicotínico a acetilcolina	132
Sondas fotoactivables	133
Espectrometría de masas	133
Antecedentes	134
Desarrollo de una sonda heterobifuncional	134
Unión del AC4-ASA al receptor nicotínico. SDS-PAGE.	134
Unión del AC4-ASA al receptor nicotínico. Ensayos de competencia.	134
Hipótesis y Objetivos	135
DESARROLLO	135
SDS-PAGE del receptor nicotínico e identificación de proteínas por MS	135
Estudio de Docking	141
Discusión	142
SDS-PAGE, digestión tróptica del receptor purificado y estudio por MS ESI TRAP	142
Ligando AC4-ASA, purificación y caracterización por MS	142
Interacción ligando-receptor, estudio de las subunidades del receptor	143
Análisis de los aductos ligando-receptor hallados	144
Estudios preliminares de Docking	145
Conclusiones	145
Antecedentes	145
Conclusiones finales	145
Referencias bibliográficas	146

RESUMEN

El receptor nicotínico es un receptor ionotrópico perteneciente a la superfamilia de canales iónicos gatillados por ligando, conocidos como receptores de lazo de cistina debido a la presencia de un par de cisteínas conservadas en puente en la región amino-terminal de todas las subunidades (1). Se encuentra ampliamente distribuido en las proteínas naturales; en los mamíferos el subtipo neuronal está presente en las sinapsis colinérgicas del sistema nervioso central y del periférico mientras que el subtipo muscular se encuentra en la placa neuromuscular.

Las alteraciones en los subtipos del receptor nicotínico ocasionan una amplia variedad de patologías en el ser humano: miastenia gravis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ciertos tipos de epilepsia, etc. (2-4).

Actualmente, existen pocas drogas con propiedades de modulación alostérica del receptor que podrían utilizarse en farmacología. Ciertos moduladores alostéricos presentan la ventaja de ser incapaces de activar

los receptores directamente y poseen una mayor selectividad.

El presente trabajo se propone estudiar la interacción de un ligando con propiedades de modulador alostérico para el receptor nicotínico a los fines de establecer cuáles son sus determinantes de unión y realizar un aporte que permita aumentar las posibilidades de intervención farmacológica de este tipo de ligandos.

Palabras claves: receptor nicotínico, ligandos alostéricos, espectrometría de masas.

SUMMARY

The nicotinic acetylcholine receptor is a member of the superfamily of ion channel receptors triggered by ligand and known as cysteine-loop receptors due to the presence of a disulfide bridged beta-hairpin formed between Cys128 and Cys142, which is the most highly conserved domain in this receptor superfamily. It is widely distributed in natural proteins; in mammalian the neuronal subtype is present at the cholinergic synapses of the peripheral and central nervous systems whereas muscle subtype is located at the neuromuscular junction. Alterations in nicotinic receptor subtypes cause a variety of pathologies in humans: myasthenia gravis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, certain types of epilepsy, etc.

Currently, there are a few drugs which are allosteric modulators of the receptor and could be used for therapeutic purposes. Certain allosteric modulators have the advantage of being unable to directly activate receptors and have greater selectivity.

In this work we studied the interaction of a ligand with properties of allosteric modulator with the nicotinic receptor, in order to establish its binding determinants and make a contribution to expand the possibilities of pharmacological intervention of this type of ligands.

Keywords: nicotinic receptor, allosteric ligands, mass spectrometry.

INTRODUCCIÓN

El receptor nicotínico a acetilcolina

El receptor nicotínico (nAChR) es un receptor ionotrópico constituido por 5 subunidades de alrededor de 60 kDa cada una que conforman un canal central que permite el paso de cationes a través de la membrana plasmática. Pertenecen a la superfamilia de receptores de lazo de cisteína, así denominada por la presencia – en la región amino-terminal de las subunidades – de un par de cisteínas altamente conservadas que forman un puente disulfuro separadas por 13 residuos de aminoácidos. Los receptores GABA_A, 5-HT₃ y de Glicina son otros miembros de esta superfamilia (5) que se extiende inclusive hasta los procariotas (6).

Subtipos

La naturaleza de las subunidades así como su estequiometría varían de acuerdo al subtipo de receptor; así pueden constituirse canales homo o heteropentaméricos (5, 7). Por ejemplo, en el subtipo muscular humano así como en el receptor del órgano eléctrico de ciertas rayas se encuentra un subtipo con la composición: 2 subunidades α , 1 β , 1 γ – en el músculo adulto 1 ϵ – y 1 δ siendo las 2 subunidades α idénticas en su secuencia (5, 8). Este subtipo tiene 2 sitios de unión para la acetilcolina en las interfases α/δ y α/γ . En el receptor nicotínico ubicado en la placa muscular la unión de acetilcolina produce la apertura del canal, el aumento de la conductancia al Na⁺ y al K⁺, y la entrada de Na⁺ que despolariza la membrana postsináptica y transmite el impulso nervioso a los músculos.

En otros subtipos se encuentran características diferentes y una composición distinta de subunidades; por ejemplo, en el subtipo neuronal $\alpha 7$ en el hombre, constituido por 5 subunidades α idénticas, existen 5 sitios de *binding*; por otro lado, en el subtipo de receptor $\alpha 4\beta 2$ existen dos sitios de *binding* α/β . En general los receptores nicotínicos neuronales están formados por 1 tipo de subunidad o la combinación de 2.

Estructura espacial del receptor nicotínico a acetilcolina

El receptor del órgano eléctrico de *Torpedo californica* posee un dominio extracelular, otro transmembránico y un tercero intracelular que constituye el llamado vestíbulo; cada subunidad tiene el N-terminal orientado hacia el espacio sináptico.

El dominio extracelular contiene el sitio de unión de ligandos formado por los denominados Loops A hasta F, constituido por un lado por la subunidad α que aporta residuos claves, predominantemente aromáticos, y por otra subunidad complementaria que puede ser α o no α y que contribuye con residuos aromáticos y con otros cargados negativamente (9). Las subunidades α se distinguen de las no α por la presencia de 2 cisteínas vecinas unidas por un puente disulfuro y ausentes en las otras subunidades. También en el dominio extracelular hay estructuras que transducen la unión de los agonistas en la apertura del canal y otras que permiten la unión de antagonistas competitivos y/o moduladores alostéricos, así como sitios de glicosilación.

El dominio transmembránico (TM) es el responsable de la estructura del poro y lo constituyen 4 segmentos hidrofóbicos de 20-30 aminoácidos que se insertan en la membrana plasmática. Los segmentos TM1, TM2 y TM3 se conectan por loops hidrofílicos cortos. El segmento TM3 se conecta con el TM4 mediante un loop hidrofílico extenso orientado hacia el citoplasma y con sitios de fosforilación. El C-terminal está orientado hacia el espacio sináptico. Los segmentos transmembránicos se disponen a manera de anillos concéntricos para formar el poro siendo TM2 el que constituye su pared interna mientras que TM1, TM3 y TM4 se mantienen en contacto con la membrana. La compuerta del canal, constituida por residuos de los segmentos TM2, está localizada cerca de la mitad de la membrana.

Sitio de unión ortostérico

El sitio de unión ortostérico se encuentra presente en las interfases α/δ y α/γ , en el dominio extracelular. La subunidad α contribuye con los Loops A, B y C. Los residuos involucrados - Figura 1 - en la unión del ligando son Tyr93 del Loop A; del Loop B proviene el Trp149 y del loop C la Tyr190 y las Cys192 y 193 - características de la subunidad α formando el puente disulfuro vecinal - y la Tyr198.

La subunidad complementaria aporta los Loops D, E y F. En el caso de la subunidad δ el Loop D aporta los aminoácidos cargados Asp180 y Glu 189, del Loop E proviene la Thr119 y del Loop F el Trp57.

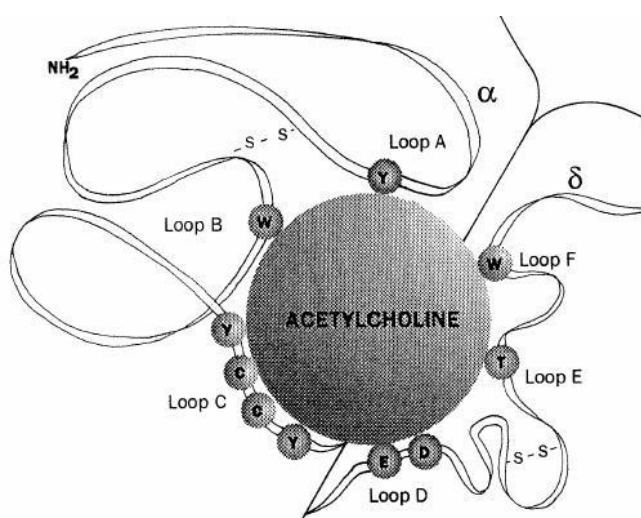


Figura 1: Sitio de unión receptor nicotínico.
Autorizado por el Dr. Arias (9)

Estructura secundaria

Unwin (10) presentó un modelo refinado con 4 Å de resolución que permitió observar que el sitio de unión de ligandos está ubicado alrededor de dos conjuntos de Hojas Beta unidas por un lazo de cisteína que forma el Cys Loop. Asimismo los Loops A-B-C y las Hojas Beta 5-6 de las subunidades adyacentes están implicados en la unión de ligando.

La pérdida del Cys Loop ocasiona importantes cambios conformacionales que conducen incluso a la pérdida de afinidad a α -BgTx (11).

Ambas subunidades α tienen una conformación distinta a la de las subunidades no α en el estado cerrado del receptor ya que muestran una rotación de 10° contraria a las agujas del reloj, conformación relacionada con un arreglo distinto de las hojas beta. Se propuso que las subunidades α están en un estado distorsionado y la unión del ligando las lleva a un estado similar al que poseen las subunidades no- α (12).

La unión de la acetilcolina produce dos eventos interconectados. Uno es una alteración local en el sitio de unión de ligandos y el otro es una alteración a gran escala, que involucra rotaciones en las dos subunidades α . Los dos TM2 también cambian su configuración en respuesta a la ACh ampliando el lumen del poro (13).

Varios componentes del dominio extracelular pueden estar involucrados en comunicar el cambio conformacional iniciado por la unión del ligando pero la estructura muestra que el Cys Loop y el Loop beta1-beta2 hacen contacto directo con los aminoácidos de TM2-TM3; el Cys Loop cerca del extremo amino de TM2-TM3 y el Beta1-Beta2 cerca de su carboxilo. Ambos loops no están en posiciones equivalentes en todas las subunidades (10).

Un gran avance en el conocimiento del sitio de unión de ligandos fue la determinación de la estructura espacial (2.7 Å) de una proteína ligadora de ACh (AChBP) del caracol (14). Es un homopentámero con estructura similar al dominio extracelular de receptores nicotínicos con 20-24% de identidad y que no posee dominio transmembránico.

Del análisis de los cristales de esta proteína unida a carbamilcolina es posible comparar la posición de los Loops C y B respecto de la del receptor. Se observa que los Loops B y C se cierran alrededor del ligando permitiendo coordinar sus cadenas laterales con grupos químicos de ligandos mientras que el movimiento del Loop A parece ser menor.

Estados conformacionales del receptor nicotínico a acetilcolina

El receptor puede adoptar distintos estados: cerrado, sensible a la acción del agonista; abierto, una vez unido al agonista, y desensibilizado con el ligando unido al receptor además del canal cerrado y no susceptible de ser estimulado nuevamente (15).

Los moduladores alostéricos son ligandos no competitivos que se unen a un sitio distinto del ortostérico y pueden ejercer su acción cambiando la afinidad del nAChR-ligando o alterando la eficacia intrínseca de la proteína. Son positivos o negativos según su capacidad de aumentar o disminuir la respuesta del receptor cuando es activado por agonistas.

Dado que el sitio de unión de ligandos está conservado en los distintos subtipos de receptor, diseñar una herramienta farmacológica que se una al sitio ortostérico de un subtipo en particular sin afectar los otros presenta dificultades; una alternativa es el diseño de moduladores alostéricos específicos para diversos subtipos de receptor.

Se describieron moduladores alostéricos tanto para receptores heteroméricos como homoméricos (16). Se agrupan en: i) moduladores alostéricos positivos que potencian la función sólo en presencia del agonista; ii) agonistas alostéricos que activan el receptor desde sitios distintos del ortostérico; iii) moduladores alostéricos negativos, que actúan como bloqueantes del canal o inhiben la activación alostéricamente; y iv) moduladores alostéricos silenciosos, que no tienen efectos en la respuesta de los agonistas pero bloquean la modulación alostérica (17). Recientemente, *Spurny et al.* (18) describieron moduladores alostéricos negativos

sobre un receptor quimera $\alpha 7$ -AChBP.

La disfunción del receptor nicotínico está implicada en alteraciones como la enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia (19), y miastenia gravis (2, 3, 20). El desarrollo de fármacos útiles en el tratamiento de dichas patologías requiere la comprensión de su estructura y función y el esfuerzo conjunto de electrofisiología, biología molecular, farmacología y química de proteínas. Una ventaja clave de ciertos moduladores alostéricos es que la modulación sólo se pone de manifiesto en presencia del agonista endógeno y de esta manera el margen de seguridad de este tipo de drogas es mayor.

Sondas fotoactivables

La marcación por fotoafinidad es muy útil en el estudio de la interacción ligando-receptor junto a cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y mutagénesis sitio dirigida. El ligando ubicado en su sitio de interacción es activado con luz UV generándose un intermediario altamente reactivo que induce su unión covalente con el receptor permitiendo establecer el sitio exacto de unión y llevar a cabo estudios mecanísticos (21). Estos reactivos presentan importantes ventajas. Por un lado, es posible seleccionar la longitud y tiempo de irradiación para controlar el grado de entrecruzamiento. Puede adicionarse un grupo marcador para facilitar su detección (radiactivo, cromóforo, etc.).

Los intermediarios generados por la irradiación son altamente reactivos, con vida media en el orden de las diezmilésimas de segundo y pueden reaccionar con distintos grupos funcionales cercanos por inserción en las uniones S-H, N-H, O-H y C-H y por adición a C=C (22). Entre los más utilizados se encuentran las arilazidas.

Los reactivos heterobifuncionales poseen un grupo fotoactivable y otro que puede ser reactivo químicamente o bien un determinante de unión que les confiera propiedades específicas de afinidad. Ambos grupos suelen estar separados mediante un brazo espaciador de longitud específica. La incubación del reactivo con el receptor lleva a su unión en el sitio específico dada la presencia del determinante de unión; luego la irradiación con luz UV produce la unión covalente.

El estudio de los aductos generados permite determinar qué regiones de la cadena polipeptídica son capaces de unir el ligando, lo que se resuelve por digestión enzimática y el análisis de la mezcla de péptidos resultante por espectrometría de masas (MS) o por el método de Edman; es posible incluso la determinación del residuo específico que une el ligando, en particular por fragmentación masas/masas (MS/MS) (23).

En el Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas se usaron sondas fotoactivables que permitieron dilucidar la unión de un ligando al receptor de prolactina hepático (24); la unión de conotoxinas al receptor nicotínico (25), y la de un nuevo ligando a receptores colinérgicos (26).

Espectrometría de masas

Esta técnica es una herramienta invaluable en el análisis de proteínas. El desarrollo de técnicas de ionización suave como lo son el *electrospray* (ESI) (27) y la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) (28) permitió la ionización y el pasaje a fase gaseosa y con ello el análisis de proteínas enteras así como el de péptidos pequeños. Ambas técnicas presentan fortalezas y limitaciones. ESI permite el fácil acople con sistemas de cromatografía líquida lo que le otorga un valioso poder resolutivo y la técnica MALDI, por su parte, permite el análisis de un gran número de muestras en unas pocas horas, con gran sensibilidad y reproducibilidad.

Los analizadores de masas determinan la relación m/z y finalmente la masa del compuesto, como ejemplos encontramos el tiempo de vuelo (TOF) y la trampa de iones (TRAP). Hoy en día se ofrecen instrumentos híbridos que combinan 2 analizadores en un mismo equipo logrando una gran versatilidad.

La MS permite conocer con gran exactitud y sensibilidad el peso molecular del analito así como obtener información estructural (29, 30). En proteínas, por medio de la fragmentación MS/MS producida por la transformación de energía cinética en vibracional por medio de colisiones, se produce la ruptura discreta de los enlaces peptídicos, de tal manera que cada molécula presenta un solo clivaje y, en conjunto, el espectro de fragmentación resulta tan propio de cada péptido como su misma secuencia.

Antecedentes

Desarrollo de una sonda heterobifuncional

En nuestro laboratorio se desarrolló una sonda heterobifuncional fotoactivable con acetilcolina - determinante de unión a receptores colinérgicos - en un extremo, unida por un brazo espaciador a un grupo arilizado fotoactivable - Figura 2 -. Dada la presencia de la acetilcolina, el brazo espaciador de 4 átomos y el ácido azidosalicílico se llamó a este compuesto AC4-ASA, sobre la base de la nomenclatura de Chatrenet et al. (1992) (33).

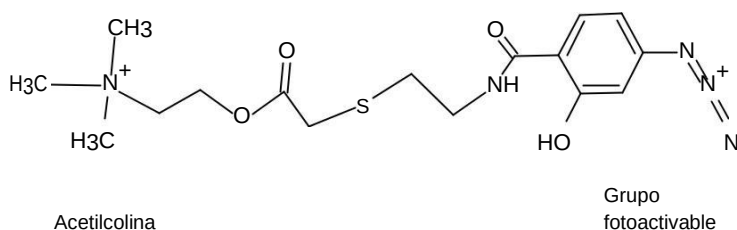


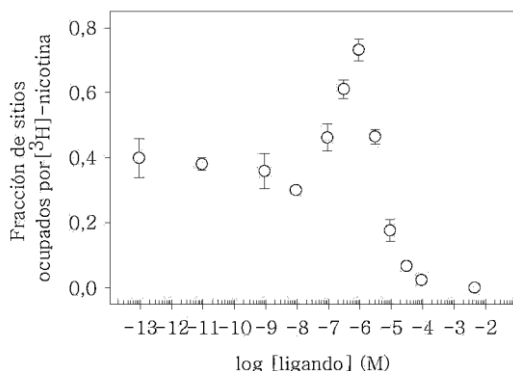
Figura 2: Estructura del AC4-ASA.

Unión del AC4-ASA al receptor nicotínico. SDS-PAGE.

Después de un SDS-PAGE la autorradiografía mostró incorporación de marca en todas las subunidades, considerablemente más intensa en α y δ , confirmando la unión específica de la sonda al receptor.

Unión del AC4-ASA al receptor nicotínico. Ensayos de competencia.

Se realizaron experimentos de unión en membranas de órgano eléctrico de *Torpedo californica*. Se ensayó como control del sistema, la competencia entre (-)-[3H]-Nicotina y concentraciones crecientes de carbamilcolina, sistema muy estudiado en la literatura. La K_d hallada para la carbamilcolina resultó concordante con la ya publicada (2,5 y 8 μ M). Luego se evaluó la capacidad del ligando de competir con (-)-[3H]-Nicotina por su unión al nAChR en el mismo sistema. Sorpresivamente. Los datos no justificaron la curva sigmoidea típica de los ensayos de competición - Figura 3 -. En efecto, hasta 10^{-8} M la fracción de sitios ocupados por nicotina permaneció constante. Sin embargo, a partir de 10^{-7} M aumentó hasta duplicar su valor inicial. A concentraciones superiores a 10^{-6} M del competidor, la fracción ocupada disminuyó llegando a un valor mínimo a concentraciones del orden de 10^{-3} M (26).

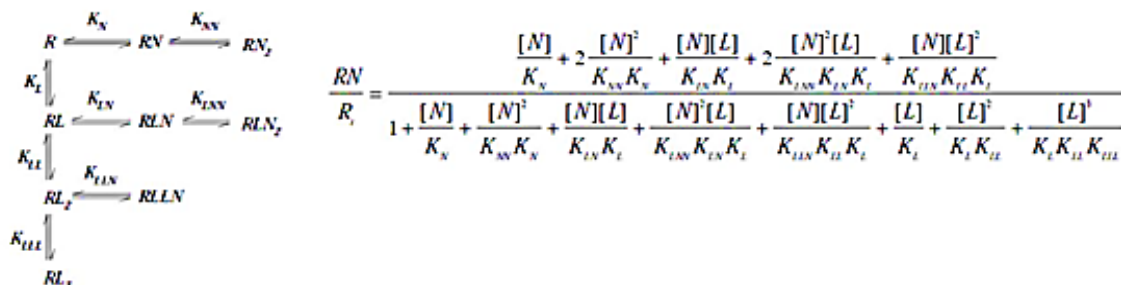


El incremento de la fracción de sitios ocupados podría explicarse por un cambio en la afinidad de la (-)-[3H]-Nicotina causado por la unión del ligando al receptor. Se postuló la unión del AC4-ASA a un sitio alostérico que conduciría a un aumento de la afinidad de la nicotina por su sitio de unión en un rango de concentraciones 10^{-7} - 10^{-6} M, para luego unirse al sitio ortostérico y desplazar a la nicotina como un agonista competitivo.

Figura 3: Ensayo de inhibición competitiva.

Las reacciones de equilibrio correspondientes al modelo propuesto se muestran en la Figura 4 (26), donde R: receptor, N: nicotina, L: Ligando: K_N : constante de disociación de nicotina y K_{LN} constante disociación de nicotina en presencia del ligando.

Figura 4: Modelo propuesto para AC4-ASA.



Hipótesis y Objetivos

El ligando AC4-ASA, sintetizado en nuestro laboratorio presenta propiedades novedosas en relación con el receptor nicotínico. Según la hipótesis de trabajo AC4-ASA posee un efecto alostérico que se traduce en un aumento de afinidad de la nicotína. El objetivo es establecer sus determinantes de unión a fin de esclarecer el mecanismo de acción alostérico.

DESARROLLO

SDS-PAGE del receptor nicotínico e identificación d e proteínas por MS

Se detectaron 4 bandas cuyo PM estimado resultó compatible con el de las subunidades del receptor - Figura 5 - (34, 35). No se observaron bandas de menor PM indicando ausencia de degradación proteica. Por digestión en solución y MS se identificaron las 4 subunidades del receptor nicotínico, Na^+/K^+ ATPasa, canal de cloruros, proteína ligadora SITS (SP105) y acetilcolinesterasa. Todas ellas pertenecen, como es de esperar, a *Torpedo californica*.

Se identificó un mayor número de péptidos para las subunidades del receptor nicotínico - Tabla 1 - (9 para α , 7 para γ , 7 para δ y 5 para β) sugiriendo su mayor abundancia. Las demás proteínas se identificaron con menor cobertura indicando una menor abundancia.

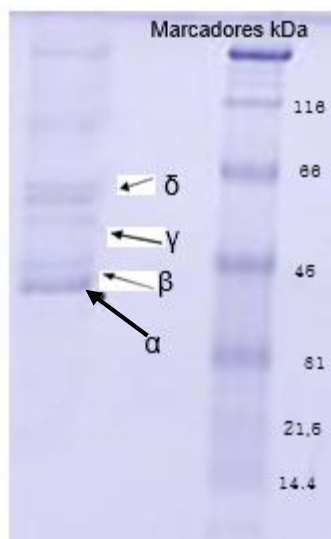


Figura 5: SDS-PAGE del receptor nicotínico.

Tabla 1: Identificación de proteínas.

ACHA_TORCA Mass: 52708 Acetylcholine receptor subunit alpha precursor - Torpedo californica (Pacific electric ray)							ACHD_TORCA Mass: 59852 Acetylcholine receptor subunit delta precursor - Torpedo californica (Pacific electric ray)							
Valor observado	Masa exp	Masa calc	Delta	Score	Expect	Peptido	Valor observado	Masa exp	Masa calc	Delta	Score	Expect	Peptido	
888.78	887.73	887.40	0.31	10	59	K.LIQLSQRG--	507.04	1012.08	1011.50	1.56	25	7.8	K.AQEYFNK.S	
922.45	921.44	921.52	-0.07	30	1.7	K.LLLLDYTGKI	549.84	1097.66	1097.58	0.08	15	53	R.TPSTHVLSTR.V	
464.02	922.03	921.52	0.51	28	3.9	K.LLLLDYTGKI	1154.53	1153.52	1153.71	-0.18	27	3.5	K.LINDLLVKN.Y	
472.96	943.90	943.49	0.42	12	17	R.QQWMDVRL	578.17	1154.33	1153.71	0.63	77	4.10E-05	K.LINDLLVKN.Y	
561.16	1120.30	1119.53	0.77	10	2.00E+02	R.WNPADYGGIK.K	599.10	1196.19	1195.61	0.59	35	0.71	K.SGIDSTNYMK.Q	
417.10	1248.28	1247.63	0.65	15	65	R.WNPADYGGIKKI	838.57	1675.12	1673.72	1.41	41	0.14	R.ADESEQPDWQNDLKL	
1290.50	1289.49	1289.70	-0.21	43	0.084	R.LVANLENN_YNKKV	1150.29	2298.58	2298.09	0.49	19	19	R.IGFGNNNNENIAASDQLHDEIK.S	
645.98	1289.95	1289.70	0.26	57	0.0039	R.LVANLENN_YNKKV	767.45	2298.09	2298.09	0.00	124	42	0.084	R.IGFGNNNNENIAASDQLHDEIK.S
755.21	1508.40	1507.74	0.66	85	6.80E-06	K.IFADDISDISGK.Q	817.77	2449.15	2449.15	0.00	10	1.20E+02	K.EKNAYDEEVGNWNLVGQTDIDR.L	
709.75	2126.21	2125.18	1.04	22	8.6	K.QVTGEVIFQTLKPNPDKS								
75.21	2262.60	2264.12	-1.51	66	0.00045	K.EKQENKIFADDISDISGK.Q								

ACHB_TORCA Mass: 56120 Acetylcholine receptor subunit beta precursor - Torpedo californica (Pacific electric ray)						
Valor observado	Masa exp	Masa calc	Delta	Score	Expect	Peptido
771.01	1540.01	1539.92	0.09	68	0.00026	R.VGLTLTNLLILNEKI
993.81	1985.60	1984.96	0.64	20	19	K.YIAEQLESASEFDLKK.D
863.12	1986.33	1984.96	1.37	17	32	K.YIAEQLESASEFDLKK.D
668.42	2002.23	2000.93	1.30	23	7.1	K.DAFTENGQWSEHKPSR.K
681.49	2041.44	2040.96	0.48	20	21	K.SYTYDTSEVTLQHALDAK.G
1021.92	2041.82	2040.96	0.86	31	1.2	K.SYTYDTSEVTLQHALDAK.G
SP15_TORCA Mass: 73407 S1TS-binding protein (SP15) - Torpedo californica (Pacific electric ray)						
Valor observado	Masa exp	Masa calc	Delta	Score	Expect	Peptido
585.71	1169.40	1168.62	0.78	42	0.1	R.YFLGSTGVAVR.V
650.15	1947.43	1948.01	-0.57	10	1.90E+02	K.SLSFSFKLSQDKTFAR.I

ACHC_TORCA Mass: 65864 Acetylcholinesterase precursor (EC 3.1.1.7) (Ache) - Torpedo californica (Pacific electric ray)						
Valor observado	Masa exp	Masa calc	Delta	Score	Expect	Peptido
852.16	2553.45	2552.31	1.14	27	27	R.VGAPGFLALHSSUEAPGNVGLDQRM
901.49	2701.44	2700.42	1.03	26	26	K.TQILLGVNKGESFFLLYGSPGFSK.D

CICH_TORCA Mass: 89390 Chloride channel protein (ClC) - Torpedo californica (Pacific electric ray)						
Valor observado	Masa exp	Masa calc	Delta	Score	Expect	Peptido
634.52	1267.03	1265.60	1.44	9	2.70E+02	R.NSGRTATSNSSGK-
895.50	1788.98	1788.93	0.06	58	0.0025	R.IQSPFLVGEVTSQK.T

Purificación y caracterización del ligando

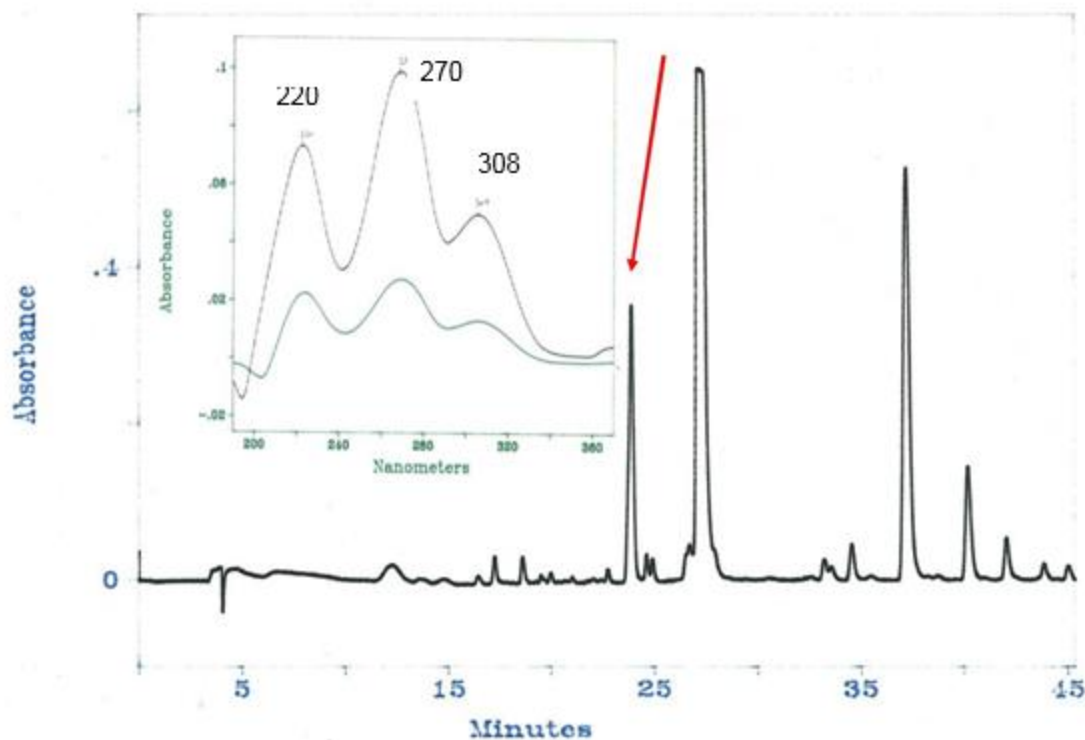


Figura 6: Purificación del AC4-ASA por RP-HPLC (Vydac 218TP52 C18 de 250 x 2.1 mm).

El ligando se purificó adecuadamente por RP-HPLC - Figura 6 -.

Para confirmar la integridad del grupo arilazido se tomó el espectro UV con máximos característicos en 220, 270 y 308 nm. El compuesto se estudió también por MS electro spray con trampa de iones (ESI TRAP) tanto en modo *full scan* como con fragmentación y el resultado ajusta a la estructura esperada - Figura 7 -.

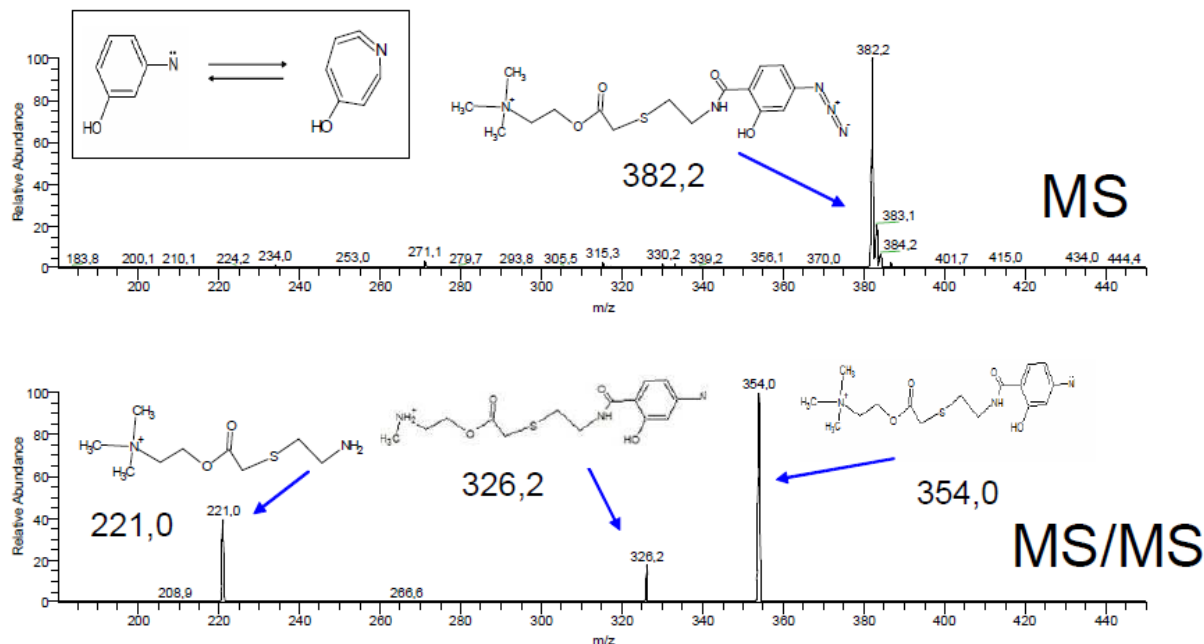


Figura 7: Espectrometría de masas ESI TRAP del AC4-ASA.

El aril nitreno puede sufrir un arreglo estructural y encontrarse en equilibrio con la especie azacicloheptatetraeno (cetenimina), y existir en un equilibrio entre estas dos especies - Figura 7 inserto - (21, 22).

El espectro MS/MS - Figura 7 - muestra la presencia de iones hijos cuyos valores m/z se ajustan a la estructura del AC4-ASA: 354 corresponde al ligando con pérdida de N_2 del grupo arilazido; 326 corresponde al ligando con pérdida de N_2 del grupo arilazido más la pérdida de 2 metilos del grupo trimetilamonio y 221 se debería al ligando con ruptura entre el nitrógeno y el carbono del carbonilo adyacente al anillo aromático.

Dado el acceso al equipamiento ubicado en el LANAIS PROEM se estudió también el ligando por MALDI TOF/TOF que posee una mayor sensibilidad, al menos un orden de magnitud. Se tomó un espectro en modo *full scan-reflectrón* - Figura 8A - para conocer el peso molecular del compuesto aislado y luego un espectro de fragmentación de las señales principales - Figura 8B -. Los resultados de fragmentación del ligando pueden mostrar iones hijos característicos que sirvan para detectarlo en aductos péptido-ligando.

Se observó la presencia de varias señales en todo el rango m/z estudiado, donde la señal m/z 382 coincide con el valor esperado para el MH^+ del AC4-ASA; el análisis de las otras señales permitió proponer que 354 sería la especie nitreno del ligando o un arreglo producido luego de la pérdida de N_2 y 386 algún tipo de especie oxidada. Curiosamente, se detectó que la matriz de MALDI puede reaccionar con el ligando ya que se observaron aductos ligando-matriz con valores m/z 499 y 543, la diferencia entre ambas señales se debe a la decarboxilación de la matriz.

En el espectro MS/MS de la señal 382 se observan iones hijos compatibles con la estructura del AC4-ASA cuyas estructuras ya fueron comentadas. La fragmentación de 543 muestra prácticamente los mismos

iones hijos confirmando que se debe a un aducto matriz-ligando. Por otro lado, el ión hijo m/z 59 proveniente de la fragmentación del grupo trimetilamonio y 221 pueden tomarse como marcadores de la presencia del ligando.

El estudio previo llevó a utilizar 12 min como tiempo de irradiación a una distancia de 5 cm y en 254 nm. Alternativamente se trabajó con luz de 366 nm a los fines de producir menor daño en el sistema.

Marcación por fotoafinidad y MS

Conocer el sitio de interacción del ligando con las subunidades del receptor nicotínico permite entender cómo ejerce sus efectos. Una estrategia es la fotomarcación por afinidad seguida de MS del analito intacto y fragmentado (23, 31). Se requieren condiciones que permitan detectar los aductos ligando-receptor y analizarlos en base a sus masas; ello requiere conocer las reacciones que pueden ocurrir entre ligando y proteína así como las masas de los compuestos intervinientes.

En los experimentos de MFA y MS primeramente se incubó el ligando con el receptor; luego de la fotólisis se une covalentemente a sus sitios de interacción y finalmente todo el sistema se digiere con tripsina. Para estudiar los aductos es necesario conocer qué masa le agrega el ligando al péptido al que está unido covalentemente. En este caso una arilazida genera un grupo nitreno altamente reactivo que se combina con la cadena peptídica; por otro lado, el grupo acetilcolina puede hidrolizarse a pH básico durante la digestión con tripsina. Algo de ligando hidrolizado también se encuentra presente al final de la incubación, antes de la fotólisis. Luego, en los ensayos de unión, los aductos hallados con el ligando hidrolizado, podrán provenir tanto de la unión del AC4-ASA hidrolizado como intacto, cuya hidrólisis ocurrió durante la digestión triptica, cuando el aducto ligando-receptor ya está formado.

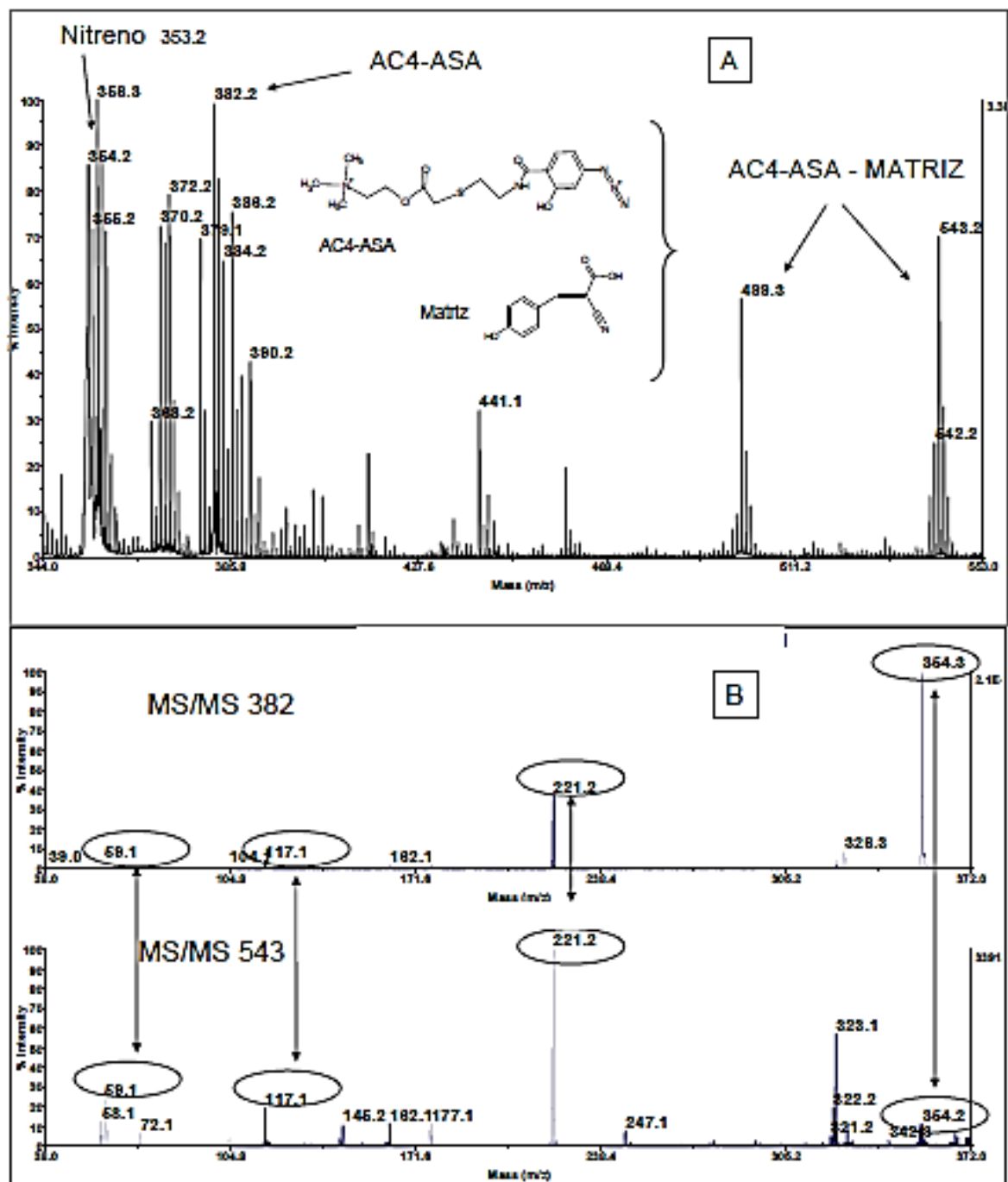
Para llevar a cabo los análisis por MS MALDI TOF/TOF se separaron las subunidades por SDS-PAGE para trabajar con un material más sencillo y por digestión en gel se obtuvieron péptidos tripticos propios de cada subunidad. Comparando sus masas con las esperadas y considerando el error de medición del equipo es posible localizar los distintos péptidos tripticos generados. El conjunto de dichos péptidos representa la cobertura para cada subunidad que mientras mayor sea brindará más información.

Resultados previos (26) indicaron mayor unión del ligando marcado a α y δ , por lo que se estudió exhaustivamente su cobertura que, si bien no resultó del 100% resultó adecuada para establecer el o los sitio/s de interacción.

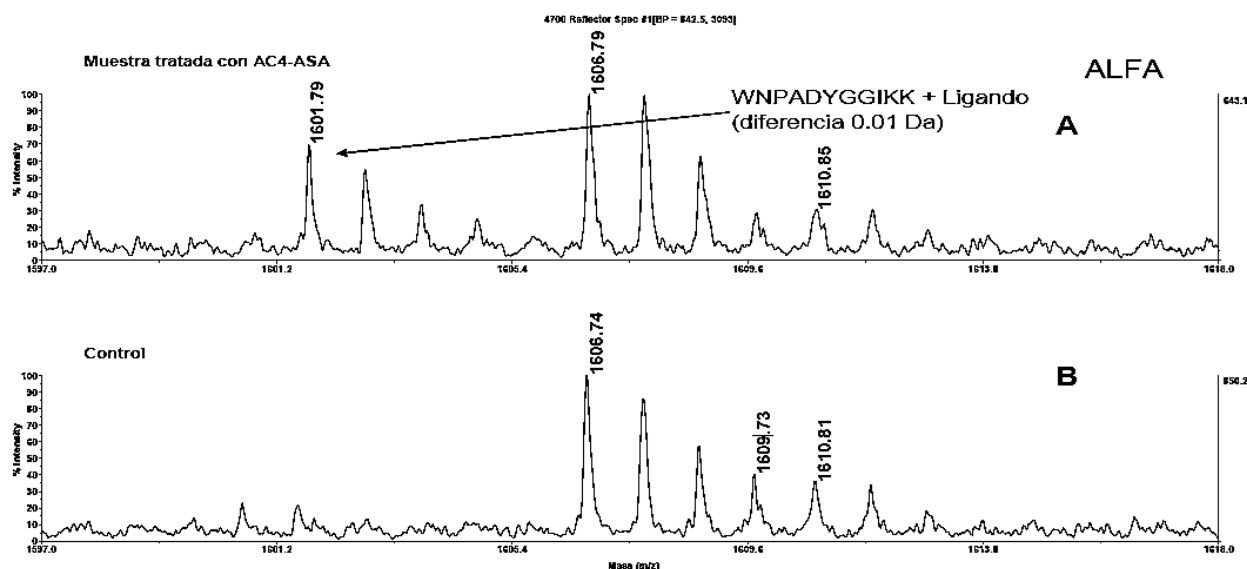
La MS MALDI TOF/TOF brinda perfiles espectrales reproducibles de digeridos proteicos, resultando óptima para comparar los resultados obtenidos a partir de las muestras control y de las tratadas. La búsqueda de señales diferenciales se inició con una minuciosa inspección visual de los espectros. Luego se empleó el programa GPMAW (36) que permite calcular qué secuencia de la proteína se ajusta mejor al valor m/z hallado. Como ejemplo para la subunidad α se encontró la señal m/z 1601,79 correspondiente al péptido WNPADYGGIKK unido al ligando sin hidrolizar con un error de 0.01 Da, Figura 9.

Las Tablas 2 y 3 muestran el resultado final de la comparación de los espectros. Para la subunidad δ los aductos están distribuidos en tres regiones: 103-127, 127-147 y 185-217. Los errores son los esperados para el instrumento utilizado y el m/z de cada señal. En todos los sectores existen secuencias que explican las señales provenientes tanto de la unión del ligando hidrolizado como del completo. Existen aductos formados tanto con el ligando entero como con el hidrolizado. Para α los aductos se encuentran distribuidos en dos regiones: 56-86 y 87-112.

Figura 8: Espectrometría de masas MALDI TOF/TOF del AC4-ASA. A: MS y B: MS/MS



Con los resultados obtenidos por MS se ubicaron en la estructura espacial los distintos péptidos que forman aductos con el ligando. Se observa en A - Figura 10 - en amarillo la sección de la secuencia de δ unida al ligando. Como se halló mas de un aducto la cadena involucrada se extiende desde el residuo 103 al 127 y se ubica frente al sitio ortostérico pudiendo estar involucrada en la interacción con ligando. En B se observa una zona de la cadena δ 128-147 ubicada en la interfase δ/β , cerca de la membrana plasmática. En C se observa otra zona de δ en que se encontró un péptido formando aducto, entre los residuos 199 y 217. En D se muestra la zona que incluye a las regiones 56-86 y 87-112 de α ; la primera cercana al extremo amino forma parte del MIR – *major immunogenic region* –mientras que la segunda se divide en dos partes, 87-107 que es una continuación de la anterior y 108-112 se ubica por debajo.



Mass (m/z)

MH+	error	Aducto	Residuos	Secuencia
2019,99	0,07	Lig2 -	103-117	QY/ HVAYFCNLVLRPN GY/ VT
2668,31	0,08	Lig1 -	108-127	YF/ CNLVLRPN GYVT WLPPAIFR / SS
1487,75	0,04	Lig1 -	108-117	YF/ CNLVLRPN GY/ VT
1467,8	0,05	Lig2 -	118-127	GY/ VTWLPPAIFR / SS

MH+	error	Aducto	Residuos	Secuencia
2098,01	0,07	Carbamidom+Lig1	128-141	FR/ SSCPINVL YFPFDW/ QN
2627,16	0,02	Lig2 -	128-147	FR/ SSCPINVL YFPFDW QNC SLK/ FT
2686,22	0,04	Carbamidom+Lig2	128-147	FR/ SSCPINVL YFPFDW QNC SLK/ FT
1739,84	0,02	Lig1 -	128-139	FR/ SSCPINVL YFPF/ DW
1405,65	0	Carbamidom+Lig1	128-136	FR/ SSCPINVL Y/ FP
1561,74	0,01	Carbamidom+Lig1	127-136	IF/ RSSCPINVL Y/ FP

MH+	error	Aducto	Residuos	Secuencia
2614,19	0,04	Lig1 -	199-217	AK/ KNIYPDK FPNG I NYQDV I / YL
2863,31	0,13	Lig1 -	185-205	AF/ TENGWEI HKPA K KNIYPDK/ FP

Tabla 2: Aductos ligando-receptor en δ . La numeración corresponde a la secuencia presente en n Uniprot y considerando la cadena madura. Carbamidom: Cys modificada con Iodoacetamida

MH+	error	Aducto	Residuos	Secuencia
1601,79	0,01	Lig 1 -	67-77	LR/ WNPADYGGIKK / IR
2937,52	0,01	Lig1 -	56-76	VR/ LRQQWIDVRLRWN PADYGGIK/ KI
2497,24	0,01	Lig1 -	68-86	RW/ NPADYGGIKKIRLP SDDVW/ LP
1415,69	0,01	Lig1 -	68-77	RW/ NPADYGGIKK / IR

MH+	error	Aducto	Residuos	Secuencia
2699,43	0,11	Lig1 -	87-107	VW/ LPDLVLYNNADG DFAI VHMTK / LL
904,45	0,04	Lig2 -	108-112	TK/ LLLDY / TG

Tabla 3: Aductos ligando-receptor en α . La numeración corresponde a la secuencia presente en Uniprot y considerando la cadena madura. Carbamidom: Cys modificada con Iodoacetamida.

Estudio de Docking

Complementariamente con el Dr Juan J. Casal se inició un estudio de docking ciego empleando como molde la estructura del receptor nicotínico 2BG9 PDB. El ligando se ubica - Figura 11 - en sitios encontrados a partir del estudio por espectrometría de masas. En una de las poses el ligando se posiciona en el bolsillo ortostérico orientando su grupo cargado hacia la zona del Loop C de α e interactúa con residuos involucrados en la unión de diversos agonistas al receptor mientras que su grupo arilazida se ubica cercano a residuos de δ . Esta pose es compatible con aductos hallados ya que el ligando queda unido a δ por la cercanía del grupo fotoactivable como se observó. Estos estudios continúan en nuestro laboratorio

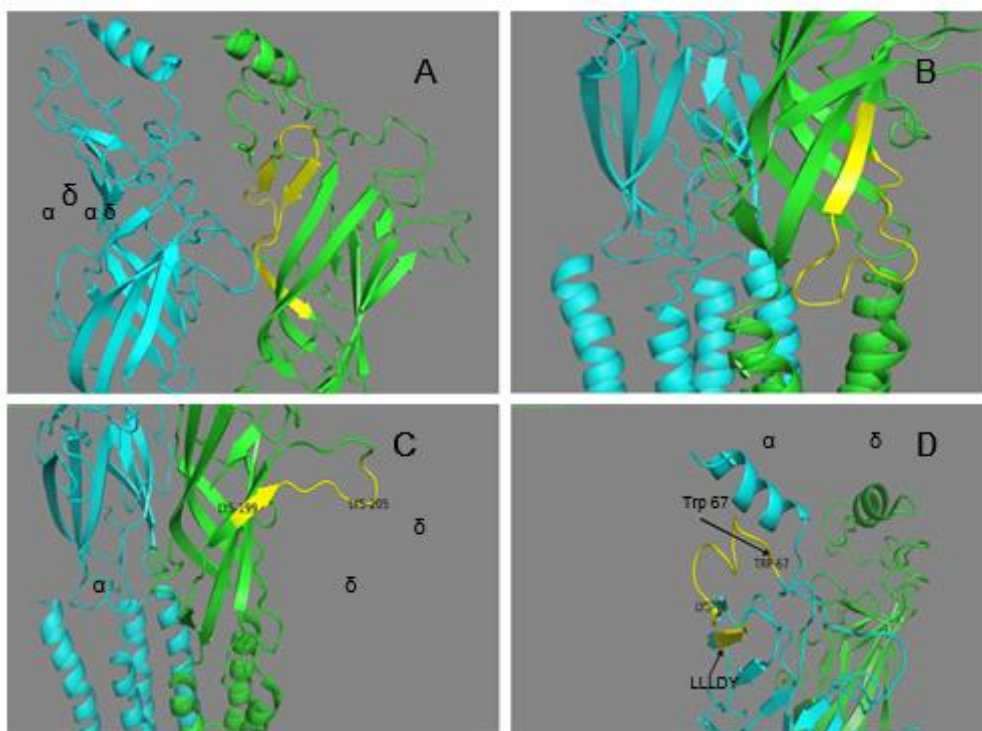


Figura 10: ubicación de los aductos en interfase α y δ .

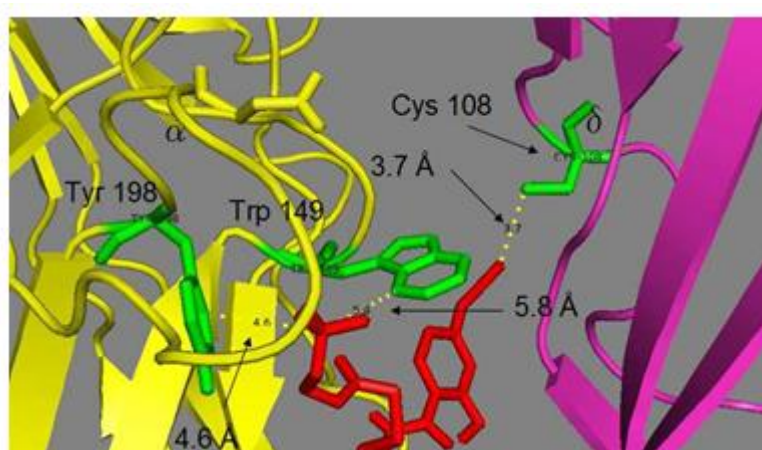


Figura 11: Docking ciego. Vista del sitio de unión ortostérico. En rojo AC4-ASA.

DISCUSIÓN

SDS-PAGE, digestión trípica del receptor purificado y estudio por MS ESI TRAP

El receptor purificado se encuentra inmerso en vesículas lipídicas (37) con el fin de mantener su estructura espacial e integridad. Su estudio por SDS-PAGE mostró la presencia de 4 bandas cuyos PM resultaron compatibles con el de las 4 subunidades que conforman el receptor, con una adecuada resolución. Es de destacar que se observó la presencia de bandas con PM mayor pertenecientes a proteínas copurificadas y que no se observaron bandas de menor PM al de las proteínas de interés por lo que se puede afirmar que las entidades moleculares presentes no se degradaron; esto es de suma importancia ya que la existencia del receptor degradado afectaría la validez de los resultados.

El estudio por MS ESI TRAP permitió identificar las proteínas copurificadas presentes en las vesículas: subunidades α , β , γ y δ del receptor nicotínico, Na^+/K^+ ATPasa, canal de cloruros, proteína ligadora SITS (SP105) y acetilcolinesterasa, todas pertenecientes a *Torpedo californica*. Se pone de manifiesto mediante el número de péptidos hallados de cada especie que hay una mayor abundancia del receptor (9 péptidos para α , 7 para γ , 7 para δ y 5 para β) y un número menor para las entidades copurificadas. Las 4 bandas inferiores presentes en el gel se corresponden con las cuatro subunidades del receptor nicotínico mientras que aquéllas con PM mayores corresponden a las 4 proteínas copurificadas; de hecho, sus PM indicados en bases de datos (www.uniprot.org) son mayores a los de las subunidades del receptor como corresponde a su ubicación en el gel.

Ligando AC4-ASA, purificación y caracterización por MS

El aislamiento del AC4-ASA se realizó por medio de un sistema RP-HPLC. Su purificación es crítica ya que compuestos con estructuras similares podrían afectar la unión del compuesto de interés a su receptor. Complementariamente, se analizó el material del pico cromatográfico por MS tanto de tipo ESI TRAP como MALDI TOF/TOF para confirmar su identidad y estructura. El espectro MS obtenido por ESI TRAP mostró una señal m/z compatible con el PM esperado para el ligando y la ausencia de otras señales, confirmando su pureza, dada la sensibilidad de esta técnica. Por otro lado, la fragmentación MS/MS confirmó de manera más específica la estructura del AC4-ASA ya que mediante el estudio de los iones hijos se puede descartar la presencia de isómeros estructurales. El resultado obtenido fue coincidente con la fragmentación esperada ya que están presentes iones hijos anticipados por la estructura del ligando.

Adicionalmente se llevó a cabo un estudio por espectrometría de masas de tipo MALDI TOF/TOF que mostró, al igual que ESI TRAP, una señal m/z compatible con el PM del ligando y un espectro MS/MS propio de su estructura. No obstante lo anterior se observaron en MALDI una serie de fenómenos no presentes en ESI como la fotólisis/termólisis del ligando durante la ionización así como su combinación con la matriz. Estas reacciones serían ocasionadas por el impacto del láser que conduce a la fotólisis parcial del ligando y así a la reacción con la matriz que está en exceso; también se explica de este modo la presencia de la especie nitreno del ligando o bien la especie azacicloheptatetraeno.

La combinación del AC4-ASA con la matriz es un hallazgo que puede tener aplicaciones de interés en otros ámbitos ya sea en experimentos de marcación *in situ* o para diseñar matrices adicionadas con compuestos fotoactivables. Por todo esto si bien MALDI es una técnica muy sensible, en el caso de este ligando y otros compuestos fotoactivables similares no es la primera opción, al menos para la confirmación de su estructura y la integridad de su grupo arilazido, por el problema de saber qué señales provienen de la muestra o son artificios de la técnica. ESI TRAP resultó más adecuado para el estudio de la identidad e integridad del ligando.

En cambio, el análisis MS/MS sí mostró una gran similitud espectral con el obtenido por ESI TRAP indicando que las características de los enlaces del ligando son las responsables del perfil de fragmentación más allá de la energía de ruptura aportada por mecanismos de fragmentación diferente.

Interacción ligando-receptor, estudio de las subunidades del receptor

La suspensión del receptor nicotínico así como su control se incubaron con el ligando, se irradiaron y las subunidades se separaron por SDS-PAGE. Se observó la correcta resolución de las bandas y, a juzgar por sus PM, no se observan diferencias entre las muestras tratadas y el control irradiado, así como tampoco en lo referente a ausencia o presencia de nuevas bandas ni en su intensidad. Se concluyó que la presencia del ligando no afecta la estructura macroscópica del receptor.

El estudio se focalizó sobre las subunidades α y δ por presentar una mayor intensidad de marca en ensayos realizados en nuestro laboratorio (26). Los espectros obtenidos a partir de las muestras tratadas así como los provenientes de los controles son similares, resultado esperable ya que el perfil de masas de los péptidos tripticos generado a partir de una proteína es muy reproducible por MALDI TOF/TOF. Esta estrategia de estudio lleva el nombre de “huella peptídica”, ya que hay una repetición de los valores m/z y de las intensidades para los espectros provenientes de péptidos tripticos de la misma proteína. Si la técnica no generase espectros reproducibles y específicos de una cadena peptídica sería muy dificultoso el análisis de las diferencias espectrales.

Una limitación característica de la estrategia MFA seguida de MS es el hecho de que por diversos motivos no se logra observar los péptidos tripticos correspondientes a toda la extensión de la cadena polipeptídica. Es decir, hay regiones de las proteínas que son invisibles al estudio de masas. Estas zonas sin cobertura espectral pueden agruparse en una región o bien distribuirse a lo largo de la cadena. Las causas pueden ser resistencia a la proteólisis de ciertos dominios de las proteínas, dificultad de ionización de los distintos péptidos generados debido a su estructura primaria o a la presencia de glicosilación y otras modificaciones postraduccionales, el largo del péptido, etc.

Para la subunidad α , la cobertura es distinta en los tres dominios del receptor; en el transmembránico es pobre, en contraposición con lo observado en el extracelular donde es casi total y aún en el intracelular. Dada dicha cobertura las conclusiones tienen particular validez para el dominio extracelular. La aparición de péptidos pertenecientes al dominio intracelular sería debida a que el receptor está incorporado a vesículas y un porcentaje de las cuales puede estar ensamblado al revés quedando el receptor invertido; por otro lado, puede ser que no todas las vesículas estén cerradas. Por lo tanto, la enzima utilizada en la digestión accedería a esas zonas de la cadena peptídica. Respecto del dominio transmembránico su baja cobertura puede deberse, entre otras cosas, al poco acceso de la enzima o a que su secuencia de aminoácidos posea pocos residuos que permitan el clivaje triptico. Para la subunidad δ el patrón de cobertura se repite respecto de α aunque es destacable la menor cobertura en la zona extracelular - Figura 12 -.

Cadena α

SEHETR LVANLLENYNKVIRPVEHHTHFVDITVGLQLQLISVDEVNQIVETNVRIR
QQWIDVRLRWNPADYGGKKIRLPSSDDVWLPDLVLYNNADGDFAIVHMTKL LLD
YTGKIMWTPPAIFKS YCEIIVTHEFDDQNCNTMKLGIWTDGKTVSISPESDRPLS I
FME SGEWVMKDYRGWKHWVYYTCCPDTPYLDITYHFIMQRIPL YFVVNVIPCLL
FSFLTGLVFYLPDTSGEKMTLSISVLLSLTVFLLVIVELIPSTSSAVPLIGKYMFLTMI
FVSSIIITVVVINTHHRSPSTHTMPQWVRKIFIDTIPNVMFSTMKRASKEKQENKIF
ADDIDISDISGKQVTGEVIFQTPLIKNPDKSAIEGVKYIAEHMKSDEESSNAEEW
KYVAMVIDHILLCVFM LICIIGTVSVFAGRIELSQEG

Cadena δ

GVNEERLINDLLIVNKYNKHVRPVKHNNVNVNIALSLTSLNLSLKE TDETLTSNV
WMDHAWYDHRITWNASEYSDISILRLPPELVWIPDIVLQNNNDGQYHVAYFCNV
LVRENGYVTVLPPAIFRSSCPINVL YFPFDWQNCSLKFTALNYDANEITMDLMDT
IDGKDYPIEWIIDPEAFTENGEWEEIHKPAKKNIYPDKFNGTNYQDVTFYLIIRKP
LFYVINFTPCVLISFLASLAFYLPAESGEKMS TAISVLLAQAVFLLTTSQRLPETALA
VPLIGKYLMMFMSLV TGVIVNCGIVLNHFRTPSTHVLSTRVKQIFLEKLPRILHMSR
ADESE QPDWQNDLKLRRSSSVGYISKAQEFNKRSELMFEKQSERHGLVPRVTP
RIGFGNNENIAASDQLHDEIKSGIDS TNYIVKQIKEKNAYDEEVGNWNLVGQITD
RLSMFIITFVMVLGTIFIVMGNFNHPPAKPFEGDFDYSSDHPRCA

Figura 12: Cobertura subunidades α y δ .

El AC4-ASA es un compuesto que contiene un resto acetilcolina en su estructura por lo que es posible suponer que presentará afinidad por el sitio de unión ortostérico ubicado en el dominio extracelular aunque también la tenga para otras zonas. La cobertura obtenida para α en el extracelular es significativa y, aunque para δ es algo menor, es adecuada para la búsqueda de posibles sitios de interacción del compuesto.

Análisis de los aductos ligando-receptor hallados

Comenzando por la subunidad δ se demostró que los aductos se agrupan en tres regiones. La primera de ellas, comprendida entre los residuos 103 y 127, está ubicada en la interfase entre α y δ . En diferentes experimentos de incubación del ligando, seguido de digestión en gel, se hallaron péptidos diferentes; puede ser que la enzima no reproduzca exactamente el corte a causa de diferencias en las muestras ocasionadas por el proceso de irradiación con luz ultravioleta o por la misma presencia del ligando unido covalentemente. Esta situación se repite en todas las zonas que poseen posibles aductos. Por otro parte, es posible pensar que el mismo ligando pueda unirse a distintos residuos circunscriptos en una zona, debido a que puede adoptar posiciones ligeramente distintas o bien fluctuar entre dos o más posiciones de interacción y la unión final ser el reflejo de un momento, una “imagen instantánea”, de una de las posiciones adoptadas. La región en donde el ligando ubica cerca su grupo fotoactivable presentará más frecuentemente residuos marcados.

Tres de las secuencias halladas que forman aductos en esta primera región de δ tienen segmentos en común ya que están solapadas, por lo que existe una zona con mayor probabilidad de marca localizada desde el residuo 108 al 117. El aducto generado en la zona comprendida entre los residuos 118 y 127 no está incluido en la región común mencionada probablemente debido a las cuestiones de posicionamiento referidas. La marca hallada en esta primera región podría deberse a la ubicación del ligando en el bolsillo ortostérico. También se observaron cortes, en ocasiones, en enlaces tirosina-X o fenilalanina-X por cierta inespecificidad de la enzima favorecidas por la secuencia local en esa región del receptor.

Debido a la baja intensidad de las señales espectrales de los aductos fue imposible la fragmentación para identificar inequívocamente a qué residuo se encuentra unido covalentemente el ligando en cada aducto propuesto. Los aductos observados corresponden tanto al ligando con su grupo éster intacto como hidrolizado por lo que se puede estimar que en esta zona se evidencia sólo el resultado de la interacción del ligando íntegro; si los aductos fuesen el resultado de la interacción del ligando entero por un lado y del hidrolizado por el otro, cabría observar zonas de interacción con una distribución sesgada en cuanto al estado del ligando en el aducto.

La segunda zona de la subunidad δ en que se observaron aductos es la comprendida entre los residuos 127 y 147 donde existe una clara región de secuencia compartida que comprende a los residuos 128 y 136; la unión del ligando tiene lugar en alguno de estos residuos. Esta segunda región se ubica a continuación de la primera zona de aductos de δ y está espacialmente orientada hacia la interfase con la subunidad β constituyendo una zona de interacción con el ligando, independiente de la anterior.

Los aductos observados en la tercera región de la subunidad δ mostraron una secuencia de aminoácidos en común comprendida entre los residuos 199 y 205 donde sólo se observaron aductos con el ligando intacto. Esta región está también ubicada en la interfase entre δ y β y por su ubicación espacial es independiente de los dos sitios anteriores.

Para la subunidad α los aductos hallados se agrupan en dos regiones, la primera de ellas comprendida entre los residuos 56 y 86 con una región de la secuencia compartida por todos los aductos y que se ubica entre los residuos 67 a 77. Notablemente, los aductos que se identifican solo indican la unión del ligando completo, con lo cual no hay incertidumbre en cuanto a que es el ligando entero el que interactúa inicialmente en esta región de la cadena α ubicada cerca de su extremo amino, sobre la interfase α/γ y por encima del sitio ortostérico. La segunda región se ubica entre los residuos 87 y 112 pero por su ubicación espacial no se puede descartar que esté relacionada a la anterior.

Estudios preliminares de Docking

Mediante el estudio de Docking ciego del ligando realizado sobre el dominio extracelular del receptor nicotínico se observó en una de la poses, que el ligando toma ubicación en el sitio ortostérico, en la interfase α/δ . El grupo acetilcolina está orientado hacia la cadena α y en proximidad a residuos aromáticos que constituyen determinantes de unión para ligandos conocidos de este receptor. Por su parte, el resto arilazido queda cercano a la subunidad δ y en particular próximo a la Cys108, y por su ubicación está incluido en el segmento de la cadena δ donde se observan los aductos comprendidos entre los residuos 103 y 127. Una pose similar adoptan otras moléculas descritas en bibliografía como la benzoilbenzoilcolina (38). La carga fija del resto acetilcolina debe ser determinante en el establecimiento del sitio de unión. La posición del AC4-ASA obtenida por Docking en el sitio ortostérico satisface esta condición dada la cercanía de la carga fija a los residuos Trp148 y Tyr198 de α . Por su parte, el resto arilazido está orientado hacia δ con lo que queda acomodada toda la estructura. Se explica así la disposición espacial que toma el ligando en el sitio ortostérico así como la formación de aductos con una porción de la cadena δ .

La ubicación efectiva del AC4-ASA en el sitio ortostérico permite predecir algún efecto sobre la función del canal de iones, como agonista o antagonista.

CONCLUSIONES

Antecedentes

Experimentos precedentes de inhibición competitiva - Figura 3, página 7 - de la unión de nicotina tritiada al nAChR llevados a cabo en nuestro laboratorio con el AC4-ASA muestran un aumento de la afinidad de la nicotina a una concentración aproximada del ligando de 0,1 a 1 μ M para luego, a concentraciones mayores, producirse su desplazamiento. Este aumento de afinidad podría ser el resultado de la unión del AC4-ASA a un sitio distinto del ortostérico.

Complementariamente, experimentos de autorradiografía llevados a cabo con el AC4-ASA radioiodinado mostraron que su marca está presente en las 4 subunidades siendo más intensa en α y δ ; asimismo, la presencia de un agonista como la carbamilcolina produce una disminución de intensidad sobre todo en la subunidad δ . Se propuso que el efecto alostérico sería ejercido por el extremo aromático del ligando y como posible sitio la subunidad δ . La caída de la marca en esta subunidad se explicaría por la competencia con carbamilcolina en el sitio ortostérico y también por la pérdida de afinidad del ligando en su sitio alostérico en presencia de un estado inactivo del receptor por las concentraciones saturantes del agonista carbamilcolina. No obstante, el ligando radioiodinado puede comportarse de manera diferente al frío dado que la incorporación de un átomo de yodo en un compuesto como el AC4-ASA puede tener impacto en la ubicación en su sitio de unión. Son necesarios experimentos con el ligando marcado con yodo frío para evaluar si se produce el mismo efecto en la unión de la nicotina.

Conclusiones finales

- Los resultados del presente trabajo caracterizan sitios de unión del AC4-ASA en las subunidades α y δ que mostraron mayor intensidad de marca por autorradiografía. La marca sobre δ se justifica por la unión a tres sitios distintos, el primero de ellos relacionado a la capacidad del ligando de unirse al bolsillo ortostérico y otros dos ubicados en la interfase entre δ y β . Por su parte, la marca sobre α se explica principalmente por la unión a una región cercana al extremo amino, con un segundo sitio que puede estar relacionado al primero.

- En principio cualquiera de los sitios de unión hallados - excepto el correspondiente a δ relacionado con la unión al sitio ortostérico - puede ser el responsable del efecto alostérico; de hecho, estudios llevados a cabo en el receptor quimera denominado $\alpha 7$ -AChBP (18) muestran un sitio de modulación alostérica coincidente con la ubicación del hallado en el presente trabajo, cercano al extremo amino de la cadena α . Este sitio posee un efecto de modulación negativa respecto del efecto del agonista natural.
- Otro aspecto interesante para futuros estudios es investigar si el efecto de aumento de afinidad se verifica para diversos ligandos y no sólo para nicotina. Dado que las interacciones que se establecen en el bolsillo ortostérico son diferentes según la molécula que se une, se podría obtener información valiosa referente a los cambios específicos que ocasiona el AC4-ASA en la posición de los residuos del receptor involucrados en la unión de la nicotina y otros compuestos.
- Quedan también planteados futuros experimentos de identificación de aductos para las subunidades γ y β . Dada la cobertura parcial obtenida para la región transmembránica no puede descartarse la existencia de sitios de unión del AC4-ASA.
- La confirmación de sitios de modulación alostérica del receptor nicotínico conduce a una mejor comprensión de su funcionamiento. Establecer cómo se puede obtener un aumento de afinidad de un agonista natural y cuál es la mecánica que produce ese cambio permitirá el desarrollo de compuestos con propiedades farmacológicas útiles para el tratamiento de condiciones patológicas en la que interviene el receptor así como el desarrollo de moléculas selectivas para los distintos subtipos del receptor presentes en el ser humano

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Karlin, A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci.* 3(2):102-14.
- 2-Barrantes, F. (1997) "Molecular Pathology of the Nicotinic Acetylcholine Receptor, from the Nicotinic Acetylcholine Receptor: Current Views and Future Trends" (Editado por F. Barrantes) Landes Bioscience, Austin, TX USA. Chapter 8.
- 3-Conti-Fine, B.M., Protti, M.P., Bellone, M., Howard J.F. (1997) "Myasthenia Gravis: The immunobiology of an Autoimmune Disease". Neuroscience Intelligence Unit, Landes Bioscience, Georgetown, TX, 203.
- 4-Ferreira-Vieira, T.H., Guimaraes, I.M., Silva, F.R., Ribeiro, F.M. (2016) Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropsychopharmacol.* 14(1):101-15.
- 5-Corringer, P.J., Le Novère, N., and Changeux, J.P. (2000) Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:431-58.
- 6-Cecchini, M., Changeux, J.P. (2015) The nicotinic acetylcholine receptor and its prokaryotic homologues: Structure, conformational transitions & allosteric modulation. *Neuropharmacology.* 96(Pt B):137-49.
- 7-Celie, P.H., van Rossum-Fikkert, S.E., van Dijk, W.J., Brejc, K., Smit, A.B., Sixma, T.K. (2004) Nicotine and Carbamylcholine Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors as Studied in AChBP Crystal Structures. *Neuron.* Vol. 41(6), 907-914.
- 8-Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M. and Rogers S.W. (2009) Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function *Physiol Rev.* 89(1): 73-120.
- 9-Arias, H. (1997) Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Research Reviews.* Volume 25, Issue 2, 133-191.
- 10-Unwin, N. (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol.* 346:967-89.
- 11-Testai, F. (2000) Tesis doctoral. FFyB. UBA. Buenos Aires.
- 12-Yakel, J. L. (2010) Gating of nicotinic ACh receptors: latest insights into ligand binding and function. *J Physiol.* 588.4 pp 597-602.
- 13-Saugueta, L., Shahsavara, A., Poitevina, F., Huonb, F., Mennyb, A., Nemecz, A., Haouzc, A., Changeuxd, J.P., Corringer, P.J., and Delaruea, M. (2014) Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 966-971: 111: 3.

- 14-Brejč, K., van Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A.B., Sixma, T.K. (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*. 411(6835):269-76.
- 15-Auerbach, A., (2015) Agonist activation of a nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology*. 96(Pt B):150-6.
- 16-Williams, D.K., Wang, J., Papke, R.L. (2011) Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: Advantages and limitations. *Biochem Pharmacol*. 82(8):915-930.
- 17-Corradi, J., Bouzat, C. (2016) Understanding the bases of function and modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors: Implications for drug discovery. *Molecular Pharmacology* 9. pii: mol.116.104240. [Epub ahead of print].
- 18-Spurny, R., Debaveye, S., Farinha, A., Veys, K., Vos, A.M., Gossas, T., Atack, J., Bertrand, S., Bertrand, D., Danielson, U.H., Tresadern, G., Ulens, C. (2015) Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 12;112(19).
- 19-Foster, D.J., Jones, C.K., Conn, P.J. (2012) Emerging approaches for treatment of schizophrenia: modulation of cholinergic signaling. *Discov Med*. 79:413-20.
- 20-Dineley, K.T., Pandya, A.A., Yakel, J.L. (2015) Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 36(2):96-108.
- 21-Bayley, H. (1983) "Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology" Ed Elsevier, The Netherlands, p26 y 33.
- 22-Scriven, E. (1998) "Azides and Nitrenes, Reactivity and Utility" Academic Press, INC, USA, p442.
- 23-Robinette, D., Neamati, N., Tomer, K.B., Borchers, C.H. (2006) Photoaffinity labeling combined with mass spectrometric approaches as a tool for structural proteomics. *Expert Rev Proteomics* 3:399-408.
- 24-Massckauchán, N. (1998) Tesis Doctoral. FFyB. UBA. Buenos Aires.
- 25-Cortez, L. (2007) Tesis Doctoral. FFyB. UBA. Buenos Aires.
- 26-Del Canto, S. (2009) Tesis Doctoral. FFyB. UBA. Buenos Aires.
- 27-Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. (1989) Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 246(4926):64-71.
- 28-Karas, M., Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10 000 Daltons. *Anal Chem*. 15;60(20).
- 29-Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A. (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 70:437-73.
- 30-Cañas, B., López-Ferrer, D., Ramos-Fernández, A., Camafeita, E. and Calvo, E. (2006) Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings In Functional Genomics And Proteomics*. vol 4. no 4. 295-320.
- 31-Xia, Y., Peng, L. (2013), Photoactivatable Lipid Probes for Studying Biomembranes by Photoaffinity Labeling *Chem Rev*. 9;113(10).
- 32-Richards, A.L., Merrill, A.E., Coon J.J. (2015) Proteome sequencing goes deep. *Curr Opin Chem Biol*. 11–17.
- 33-Chatrenet, B., Kotzba-Hibert, F., Mulle, C., Changeux, J.P., Goeldner, M.P., Hirth, C. (1992) Photoactivatable agonist of the nicotinic acetylcholine receptor: potential probe to characterize the structural transitions of the acetylcholine binding site in different states of the receptor. *Mol Pharmacol*. 41:1100-6.
- 34-Tierney, M. L., Osborn, K. E., Milburn, P. J., Stowell, M. H. B., Howitt, S. M. (2004) Phylogenetic Conservation of Disulfide-Linked, Dimeric Acetylcholine Receptor Pentamers in Southern Ocean Electric Rays. *Journal of Experimental Biology*. 207: 3581-3590.
- 35-www.uniprot.org
- 36-www.gpmaw.com
- 37-Ochoa, E.L., Biscoglio de Jiménez Bonino, M.J., Cascone, O., Medrano, S., Cousseau, M.B. (1983) The nicotinic acetylcholine receptor from *Discopyge tschudii*: purification, characterization and reconstitution into liposomes. *Comp Biochem Physiol. C* 76:313-7.
- 38-Wang, D., Chiara, D.C., Xie, Y. and Cohen, J.B. (2000) Probing the Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor with 4-Benzoylbenzoylcholine, a Novel Photoaffinity Competitive Antagonist. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275, No. 37, Issue of September 15, pp. 28666–28674.