
SUMARIO



ANALES 2013

MEMORIA	4
JORNADAS	
157º JORNADA CIENTÍFICA	16
“Resistencia bacteriana y uso racional de los antibióticos”	
SIMPOSIO	
“Farmacopeas”	32
SIMPOSIO	
"Bioquímica traslacional y vinculación tecnológica"	114
CONFERENCIAS	
CONFERENCIA DE INCORPORACION	
Dr. Alberto Diaz	120
PREMIOS	
PREMIO “AGUSTIN MARENZI” – QUIMICA BIOLOGICA	143
“Influencia del entorno lipídico sobre la actividad biológica de las proteínas integrales de membrana”.	
Dres. María Florencia Pignataro, Martín M. DodesTraian, F. Luís González Flecha e Irene Mangialavori	
IN MEMORIAM	184



ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

**MEMORIA
2013**

CONSEJO DIRECTIVO

ASUNCIÓN DE NUEVAS AUTORIDADES

El 25 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: Vicepresidente, Prosecretario, Protesorero, 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. Carlos M. Baratti
Vicepresidente:	Acad. Miguel Ángel Caso
Secretario General:	Acad. Gabriel Mato
Prosecretario:	Acad. Marta M. Salseduc
Tesorero:	Acad. Manuel R. Limeres
Protesorero:	Acad. Miguel D' Aquino
Vocales Titulares:	Acad. Juan Pablo F.C. Rossi Acad. Carlos A. Gotelli
Vocales Suplentes:	Acad. Otmaro E. Roses Acad. Modesto C. Rubio
Revisores de Cuentas:	Acad. Alfredo A. Hager Acad. Osvaldo Cascone Acad. Francisco Stéfano

El Consejo Directivo realizó durante este período diez (10) reuniones y el Claustro Académico se reunió en ocho (8) 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

El 27 de julio se llevó a cabo el acto de incorporación del Académico Correspondiente Alberto Diaz.

El Académico ingresante dictó una Conferencia de incorporación, según lo especificado en el Estatuto, y se les hizo entrega de la medalla y diploma correspondientes, según el detalle que figura en el anexo III.

ENTREGA DE DIPLOMAS A ACADEMICOS

En la reunión de Claustro del día 27 de junio fue electocomo Académico Emérito el Académico Titular Dr. Ronaldo Meda.

En la reunión de Claustro del día 27 de junio la Académica Correspondiente Dra. María Luz Pita Martin de Portela fue electo como Académico Titular.

En la reunión del 25 de julio fueronelectoscomo Académicos Eméritosel Académico Titular Dr. Sem MisaelAlbónico y el Académico titular Rubén Rondina.

El 21 de noviembre se entregaron las medallas y diplomas correspondientes a Académicos Eméritos a los Académicos Titulares Ronaldo Meda y Sem MisaelAlbónico. En el mismo acto se entrego el diploma correspondiente a Académico titular a la académica correspondiente Maria Luz Pita Martin de Portela.

“IN MEMORIAM”

Durante este año hubo que lamentar el fallecimiento de losAcademicos Eméritos Héctor Martín Chechile, Antonio Francisco Somaini y Víctor Daniel Rondina y los Académico Correspondiente Hugo Guillermo Pérez y Anibal G. Amat.

PREMIOS

En la 157ª Jornada Científica: **“Resistencia bacteriana y uso racional de los antibióticos”**, realizado el 15 de agosto del corriente año, se hizo entrega del Premio Anual de la 156ª Jornada Científica: *“Alimentos Funcionales, Nutrición y Salud”*, correspondiente al año 2012.

PREMIO ANUAL 156ª JORNADA CIENTÍFICA

Estudios in vitro e in vivo de una crucífera: *Nasturtiumofficinale*

L. Casanova, Natalia A.; López Nigro, Marcela M. y Carballo, Marta A. CIGETOX – INFIBIOC, FFyB, UBA, Buenos Aires, Argentina.

Productos cárneos emulsionados saludables

MARCHETTI, Lucas¹, ARGEL, Natalia², ANDRÉS, Silvina, C.¹, CALIFANO, Alicia, N.¹

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET y ²Fac. Ciencias Exactas, UNLP, 47 y 116, La Plata (1900), Argentina.

ACCESIT AL PREMIO 156º JORNADA CIENTÍFICA:

Dietas con alta concentración lipídica: efecto sobre triglicéridos y colesterol sérico de ratas.

Perris Paula, Fernandez I, Mambrin C, Sanahuja M.C, Slobodianik N, Feliu MS. Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Buenos Aires, Argentina.

Estudio de la termooxidación de aceites mezcla girasol-chía mediante DSC

Guiotto EN ^{1,2}, Ixtaina VY ^{1,2}, Nolasco SM ², Tomás MC ¹ CIDCA, FCE, UNLP, CONICET ² TECSE, FIO, UNCPBA. Argentina

PREMIOS 2013

Se otorgó el Premio 2013:

PREMIO AGUSTÍN D. MARENZI

“Influencia del entorno lipídico sobre la actividad de las proteínas integrales de membrana. La bomba de Calcio como modelo”.

Pignataro MF, DobesTraín M, González Flecha FL y Mangialavori I.

Se declararon **desiertos** los Premios R Gershman (Fisiología), JC García Fernández (Toxicología) y V Nethol (Cosmética).

CONFERENCIAS

DE INCORPORACION COMO ACADEMICO CORRESPONDIENTE

El día 27 de junio, se celebró en el Salón de Conferencias “Pbro. Antonio Sáenz” la incorporación del Dr. Alberto Diaz como Académico Correspondiente Este brindó una conferencia titulada: *“Biotecnología: puente entre la investigación, la industria y la salud pública”*. Fue presentado por el Académico Titular Marcelo Naccuchio.

REUNIONES CIENTIFICAS

El 15 de agosto se llevó a cabo las 157º Jornada Científica titulada **“Resistencia bacteriana y uso racional de los antibióticos”**, coordinada por el Académico Gabriel Gutkind.(Anexo IV)

Asimismo se realizó el jueves 20 de septiembre por parte de la Sección Ciencias Básicas, Simposio **“FARMACOPEAS”**, bajo la coordinación del Académico Carlos Gotelli.(Anexo V)

El 21 de noviembre se llevo a SIMPOSIO **“Bioquímica Traslacional Y Vinculación Tecnológica”** coordinado por El Acad. Dr. Juan Pablo Rossi (Anexo VI)

AUSPICIOS DE LA ACADEMIA A REUNIONES CIENTÍFICAS

Instituto Argentino de Educación e Investigación en Nutrición (IAEDIN): Curso de Postgrado “Nutrición en Neonatología.

52° Meeting Internacional de Toxicología Forense celebrado en conjuntamente con el X Congreso Regional de TIAF y el II Congreso de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Forenses.

Simposio de “Farmacología de Inmunosupresores utilizados en el trasplante” organizado por el Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan Garrahan.

Colegio oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal “Jornada 50 años de Historia y Ciencia”

Auspicio al XII Congreso Nacional Bioquímico – 70° Congreso Argentino de Bioquímica – CUBRA XII, a realizarse en Bs.As. En octubre/13. Adjuntan información preliminar

Auspicio y difusión del *Congreso Argentino de SAEGRE* (Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva) y al *Encuentro Latinoamericano de la Especialidad*, a realizarse en Buenos Aires en abril/2014.

RELACIONES CON OTRAS ACADEMIAS NACIONALES

Se mantiene una relación directa, asistiendo a la mayoría de las incorporaciones y actos programados, a los que fue invitada la Academia. En forma especial merece destacarse:

- Asistencia del Vicepresidente de esta Academia Acad. Dr. Miguel A. Caso a la Academia Nacional de Medicina el 19 de abril con motivo del ciclo Científico Cultural 2013, en conjunto con la Fundación OSDE. El Prof. LucMontagnier disertó sobre “SIDA y enfermedades crónicas: Nuevos enfoques conceptuales y tecnológicos”
- Asistencia del Vicepresidente de esta Academia Acad. Dr. Miguel A. Caso, el 10 de junio, a la Academia Nacional de Periodismo con motivo de la Pluma de Honor 2013 a la Señora Beatriz Sarlo.
- Asistencia del Vicepresidente de esta Academia Acad. Dr. Miguel A. Caso al acto organizado por el Instituto Nacional Belgraniano en homenaje al Dr. Manuel Belgrano, el Día de la Bandera Nacional Argentina y el 69° aniversario de la fundación del Instituto Nacional Belgraniano.
- Asistencia del Acad. Correspondiente Dr. Marcelo Squassini a la Academia Nacional de Educación, el 1° de julio, con motivo de la designación del Acad. Avelino Porto como Presidente de Honor de la ANE
- Asistencia del Acad. Correspondiente Dr. Marcelo Squassini a la Academia Nacional de Educación, el 5 de agosto, con motivo de la disertación sobre “Homenaje a la Asamblea General Constituyente del Año XIII en su bicentenario continuadora de la Revolución de Mayo y anticipadora de la República”
- Asistencia del Vicepresidente de esta Academia Acad. Dr. Miguel A. Caso al acto organizado por la Academia Nacional de la Historia, en conjunto con la Embajada de la República del Perú, en conmemoración del 190! Aniversario de la Constitución de la República del Perú
- Asistencia del Vicepresidente de esta Academia Acad. Dr. Miguel A. Caso al acto organizado por el Instituto de Política Ambiental de la Academia Nacional de Ciencias Morales y Políticas a la sesión sobre “Hacia una estrategia nacional de conservación de la biodiversidad” realizada el 29 de agosto donde disertaron la Lic. Andrea Michelson “Áreas protegidas: su sobre “Protocolo de Nagoya sobre acceso a recursos genéticos y la participación justa y equitativa de los beneficios. Desafíos de su implementación para el Derecho Ambiental”
-

- Asistencia del Vicepresidente de esta Academia Acad. Dr. Miguel A. Caso al acto organizado por la Academia Nacional de la Historia, el 8 de octubre, con motivo de la incorporación del académico correspondiente en la provincia de Buenos Aires, Dr. Bernardo LozierAlmazon quien disertó sobre “Santiago de Liniers: Nuevos aportes biográficos”
- Asistencia del Vicepresidente de esta Academia Acad. Dr. Miguel A. Caso al acto organizado por la Academia Nacional de la Historia y el Instituto de Historia Militar Argentina, el 24 de octubre, en Homenaje a las Guardias Nacionales.
- Asistencia del Vicepresidente de esta Academia Acad. Dr. Miguel A. Caso al acto organizado por el Instituto de Política Ambiental de la Academia Nacional de Ciencias Morales y Políticas, el 31 de octubre, donde el Ing. Jorge Aceiro, disertará sobre “Crisis energética ¿tiene solución? Eventual influencia sobre el medio ambiente.”
- Asistencia del Vicepresidente de esta Academia Acad. Dr. Miguel A. Caso al acto organizado por la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria el 21 de noviembre con motivo de la incorporación del Académico Correspondiente Doctor Alberto Guglielmone, quien disertó sobre el tema: “Las garrapatas (Ixodidae) de la Argentina como parásitos de los vacunos y el hombre”.
- Asistencia del Vicepresidente de esta Academia Acad. Dr. Miguel A. Caso al acto organizado por la Academia Nacional de Ciencias Morales y Políticas, el 30 de octubre, con motivo de la incorporación del Académico de Número almirante Enrique Molina Pico, quien disertó sobre el tema: *Ser militar en la Argentina de hoy*”.

•

RELACIONES CON OTRAS INSTITUCIONES Y PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

- Asistencia del Presidente de la Institución, Académico Dr. Carlos M. Baratti; el Secretario General Académico Dr. Gabriel Mato, el Tesorero Académico Dr. Manuel R. Limeres y el Académico Modesto C. Rubio al almuerzo realizado el 26 de marzo por la Sección Primera de Bioquímicos en el Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos.
- Asistencia del Presidente de la Institución, Académico Dr. Carlos M. Baratti y el Secretario General Académico Dr. Gabriel Mato al acto conmemorativo de los “55 años de creación del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas” realizado el 10 de septiembre-

•

PUBLICACIONES

Revista Farmacéutica 155nº 1 (2013) versión electrónica.

Anales de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica (Año 2012) versión electrónica.

ENTIDADES COOPERADORAS DE LA ACADEMIA

En la Revista Farmacéutica se mencionan las Entidades Cooperadoras que apoyan económicamente a la Academia, permitiendo así su normal funcionamiento. (Se mencionan en el anexo VII).

ACTO DE FIN DE AÑO

El 12 de diciembre tuvo lugar en la sede de nuestra Academia el brindis de Fin de Año.

•

ANEXO I

COMISIONES 2013

(Por orden alfabético)

Publicaciones

Acad. Dr. Modesto Rubio (Coordinador), Acad. Manuel R. Limeres, Acad. Mario A. Los, Acad. Marcelo C. Nacucchio, Acad. María Luz Pita Martín, Acad. Marta Salseduc, Acad. Marcelo Squassini

Premios y Distinciones

Carlos M. Baratti (Coordinador), Clyde N. Carducci, Osvaldo Cascone, Miguel A. Caso, Alfredo A. Hager, Mario Los, Alfredo Salibián

ANEXO II

MIEMBROS

ACADÉMICOS TITULARES

Acad. María Cristina Añón
Acad. Carlos M. Baratti
Acad. Mirta J. Biscoglio
Acad. Alberto A. Boveris
Acad. Carlos Bregni
Acad. Rodolfo Brenner
Acad. Nestor O. Caffini
Acad. Clyde N. Carducci
Acad. Ricardo A. Caro
Acad. Osvaldo Cascone
Acad. Miguel A. Caso
Acad. Miguel D' Aquino
Acad. Tomás de Paoli
Acad. Luis Eduardo Diaz
Acad. Carlos H. Gaozza
Acad. Hector I. Giuliani
Acad. Gabriel O. Gutkind
Acad. Carlos A. Gotelli
Acad. Alfredo A. Hager
Acad. Silvia Hajos
Acad. Manuel Limeres
Acad. Mario A. Los
Acad. Horacio José Gabriel Mato
Acad. Marcelo C. Nacucchio
Acad. MaríaLuzPita Martín dePortela
Acad. Marco Pizzolato
Acad. Edgardo Poskus
Acad. Ruben V. D. Rondina †
Acad. Otmaro E. Roses
Acad. Juan Pablo F.C. Rossi
Acad. Modesto C. Rubio
Acad. Alfredo Salibian
Acad. Marta M. Salseduc
Acad. José Alberto Santomé
Acad. Francisco J.E. Stefano
Acad. María Guillermina Volonté
Acad. Regina L. W. de Wikinski

ANEXO II

ACADEMICOSCORRESPONDIENTES

ARGENTINA

Acad. Marcelo O. Cabada
Acad. Alberto Diaz
Acad, Jorge Errecalde
Acad. Oscar H. Fay
Acad. Raul C. Fazio
Acad. Aida Pesce de Ruiz Holgado
Acad. Guillermo R.Lossa
Acad. Ruben H. Manzo
Acad. Modesto P. Montecchia
Acad. Aldo D. Mottino
Acad. Elsa M. Nadalin
Acad. Jorge O. Nicolini
Acad. Otto A. Orsingher
Acad. Ana Maria PechenD'Angelo
Acad. Gabriela Del Valle Perdigón
Acad. Hugo G. Pérez †
Acad. Clelia M. Riera
Acad. Daniel O. Sordelli
Acad. Marcelo D. Squassini

ALEMANIA

Acad. Pablo Steinberg

BRASIL

Acad. Aluísio Pimenta
Acad. Caio Romero Cavalcanti

CHILE

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

COLOMBIA

Acad. Fleming Martíne Rodríguez

CUBA

Acad. Ricardo Galvis
Acad. Héctor Zayas Bazan Y Perdomo

ECUADOR

Acad. Julio F. Araoz
Acad. Eduardo Goetchel

ANEXO II

ACADEMICOSCORRESPONDIENTES

ESPAÑA

Acad. María del Carmen FrancésCausapé

Acad. Tomás AdzetPorredón

Acad. Francisco Zaragoza García

Acad. Eduardo MariñoHernández

Acad. Miguel Ylla Catalá Genis

Acad. Antonio Monge Vega

ESTADOS UNIDOS

Acad. Jorge R. Barrio

Acad. Jorge D. Brioini

Acad. Marcel E. Nimni

FRANCIA

Acad. Jean Marc Aïache

Acad. Paul Fleury

Acad. Carlos Soto

ITALIA

Acad. Stefano Govoni

MEXICO

Acad. Pedro Joseph Nathan

PANAMA

Acad. Ceferino Sánchez

PARAGUAY

Acad. Luis H. Berganza

PERU

Acad. BerthaParejaPareja

Acad. Fernando Quevedo Ganoza

Acad. José Amiel Pérez

VENEZUELA

Acad. José Luis Andrade

URUGUAY

Acad. Jorge Ares Pons

Acad. Cayetano Cano Marotta

Acad. Cosme de los Santos Carvallido

Acad. UberfilDelbene Garate

Acad. Pietro Fagiolino

Acad. Raquel Lombardo de Bertolaza

Acad. Justo Emilio Menes

Acad. Patrick Moyna

Acad. Anibal Alberto Olmos Ferreira

Acad. Oscar Polla Bermudez

Acad. Joaquin E. RoyerMeicoso

ANEXO II

ACADEMICOS EMERITOS

Acad. Sem M. Albonico
Acad. Arnaldo L. Bandoni
Acad. Jorge D. Coussio
Acad. Hector M. Chechile†
Acad. Mateo Chekherdemian
Acad. Enrique Iovine
Acad. Ronaldo Meda
Acad. Horacio B. Rodríguez
Acad. Antonio F. Somaini†

ACADEMICOS HONORARIOS

ARGENTINA

Acad. Juan Carlos Bagó

BRASIL

Acad. Evaldo De Oliveira

ESPAÑA

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

ITALIA

Acad. Rodolfo Paoletti

ANEXO II

SECCIONES

- A) SECCION CIENCIAS BIOQUIMICAS (19 miembros)
- B) SECCION CIENCIAS BASICAS (9 miembros)
- C) SECCION CIENCIAS FARMACEUTICAS (17 miembros)

SECCION A: CIENCIAS BIOQUIMICAS

Acad. María Cristina Añón
Acad. Mirtha Biscoglio
Acad. Rodolfo Brenner
Acad. Néstor O. Caffini
Acad. Osvaldo Cascone
Acad. Héctor I. Giuliani
Acad. Silvia Hajos (Coordinador Alterno)
Acad. Ronaldo Meda
Acad. María L. Pita Martín de Portela
Acad. Marco Pizzolato
Acad. Edgardo Poskus
Acad. Otmaro E. Roses
Acad. Juan Pablo F.C. Rossi (**Coordinador**)
Acad. Alfredo Salibian
Acad. José A. Santomé
Acad. Daniel Sordelli
Acad. Regina L.W. de Wikinski

ANEXO III

Buenos Aires, junio de 2013.

La ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA tiene el agrado de invitar a usted y familia a la SESION PÚBLICA EXTRAORDINARIA que, con motivo de incorporar como Académico Correspondiente al Dr. Alberto Díaz celebrará el jueves 27 de junio, a las 18.00 horas, en su sede Facultad de Farmacia y Bioquímica, Salón de Conferencias “Pbro. Antonio Sáenz”, Junín 956, Buenos Aires.

Saludamos a usted con nuestra más distinguida consideración.

Acad. Gabriel Mato
Secretario General

Acad. Carlos M. Baratti
Presidente

PROGRAMA

Palabras de apertura a cargo del Sr. Presidente de la Academia Acad. Dr. Carlos M Baratti.

Presentación del Dr. Alberto Díaz a cargo del Académico Titular Marcelo Nacucchio.

Discurso de incorporación del Señor Académico Alberto Díaz quien disertará sobre el tema:

“Biotecnología: Puente Entre La Investigación, La Industria Y La Salud Pública.”

Entrega de medalla y diploma al Académico Titular Alberto Díaz por el Sr. Presidente Carlos M. Baratti.

ANEXO IV

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Sala de conferencias: "Pbro. Antonio Sáenz"
157° JORNADA CIENTIFICA
"Resistencia bacteriana y uso racional de los antibióticos"
Coordinador
Acad. Dr. Gabriel Gutkind
Buenos Aires – Argentina
15 de agosto de 2013

PROGRAMA

10.00 a 12.00	Exhibición de posters
13.00 a 13.10	Palabras de apertura por el señor Presidente Acad. Carlos M. Baratti.
13.15 a 13.50	Conferencia Marcela Radice: "Multirresistencia en bacilos gram-negativos" Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA
14.00 a 14.30	Conferencia Jorge Errecalde: "Pautas farmacocinético-farmacodinámicas para el uso prudente de antimicrobianos" Académico Correspondiente de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Veterinaria- UNLP
14.30 a 15.00	Conferencia Rodolfo Quiroz: "Medidas efectivas para prevenir las infecciones asociadas al cuidado de la salud y la emergencia y desarrollo de resistencia bacteriana en el ámbito hospitalario" Jefe de Infectología, Prevención y Control de Infecciones Hospital Universitario Austral
15.00 a 15.30	Conferencia Guillermo Lossa: "Infección hospitalaria y multirresistencia. ¿Un problema a resolver en forma interdisciplinaria e interinstitucional?" Académico Correspondiente de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.
15.30 a 16.00	Mesa redonda "Optimización del uso de drogas antimicrobianas y resistencia- Del paciente a la multidisciplinaredad" Coordinación Gabriel Gutkind Académico titular de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica
16.00 a 16.30	Café
16.30 a 17.15	Conferencia Alejandro Vila: "Metallo-beta-lactamasas: ¿Resistencia todo terreno? ¿Podemos detenerlas?" Alejandro J. Vila, IBR (CONICET- UNR) Rosario, Argentina.
17.30	Entrega de premios 156ª jornada científica 2012

Multiresistencia en bacilos gram-negativos

Dra. Marcela Radice
Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA

El notable aumento de la resistencia a antibióticos en los bacilos gram-negativos refleja la habilidad de los microorganismos para reclutar, mantener y expresar marcadores de resistencia. Muchos de estos microorganismos encuentran en el ambiente hospitalario un hábitat propicio para su permanencia y diseminación, constituyendo agentes causales de muchas de las infecciones adquiridas en el hospital.

Los antibióticos β -lactámicos representan el grupo de drogas antimicrobianas más utilizado para el tratamiento de las infecciones. La resistencia adquirida resulta de mecanismos variados que incluyen la inactivación enzimática y la disminución de la concentración de la droga en el sitio blanco, siendo la importancia relativa de cada mecanismo variable en los distintos grupos de microorganismos, y en muchos casos co-existiendo más de un mecanismo. Las enzimas con capacidad de hidrolizar estos antibióticos, β -lactamasas, conforman un grupo heterogéneo de enzimas pertenecientes a las serino-enzimas y metaloenzimas. Dada su relevancia clínica cabe mencionar a las β -lactamasas de espectro extendido de tipo cefotaximasas, las enzimas de tipo OXA con actividad sobre carbapenemes, las carbapenemasas de tipo KPC y las metalocarbapenemasas de tipo IMP, VIM y NDM.

La resistencia a quinolonas, en este grupo de microorganismos, normalmente está mediada por mecanismos que involucran determinantes cromosómicos, como la alteración de los sitios blanco, la disminución de la permeabilidad de la membrana externa y el aumento del eflujo mediado por bombas de expulsión. En los últimos años ha sido notable, el surgimiento y la diseminación de nuevos mecanismos cuyos determinantes se localizan a nivel plasmídico, los cuales incluyen la protección del blanco molecular por las proteínas Qnr, la modificación de las fluoroquinolonas por una enzima codificada por el gen *aac (6')-Ib-cr* y la expulsión por bombas de eflujo de tipo QepA y OqxAB.

La resistencia adquirida a aminoglucósidos se debe principalmente a la producción de enzimas de tipo acetilasas, adenilasas y fosfatasa que modifican grupos sustituyentes de la molécula, lo que resulta en un compuesto de baja afinidad por el ribosoma bacteriano. También contribuyen a esta resistencia las alteraciones en los sitios de unión, la disminución del ingreso de las drogas por alteraciones a nivel de la membrana externa y una expulsión aumentada de las mismas.

Pautas farmacocinético-farmacodinámicas para el uso prudente de antimicrobianos

Jorge O. Errecalde
Facultad de Veterinaria- UNLP

Desde el descubrimiento de la penicilina, en 1928, una gran cantidad de antimicrobianos han sido introducidos en la práctica. La emergencia de resistencias bacterianas, ha sido la causa de la necesidad de nuevos fármacos a lo largo del tiempo. En los últimos años, el incremento del conocimiento de la resistencia antimicrobiana y de la interrelación farmacocinético-farmacodinámica ha generado lo que hemos venido llamando una nueva revolución en la terapia antimicrobiana. La emergencia de bacterias resistentes consecuencia de presión quimioterápica, sumada a la magnitud del intercambio genético entre bacterias en reservorios como por ejemplo el intestino, tornan este fenómeno en algo de capital importancia tanto en salud animal como en salud humana.

La comprensión de los mecanismos de generación de resistencia y su transferencia es esencial para mitigar la emergencia de nuevas bacterias resistentes. Hasta hace poco tiempo, la farmacocinética (Pk) y la farmacodinamia (Pd) de los antibacterianos eran consideradas independientemente. La integración de ambas, a través de una nueva disciplina, la modelización Pk-Pd, ha permitido continuar avanzando en el campo de los agentes antibacterianos, especialmente, en aquellos aspectos relativos a los planes de administración, es la búsqueda de mayores eficacias y menor emergencia de microorganismos resistentes.

Medidas efectivas para prevenir las infecciones asociadas al cuidado de la salud y la emergencia y desarrollo de resistencia bacteriana en el ámbito hospitalario

Dr. Rodolfo E. Quirós

Jefe de Infectología, Prevención y Control de Infecciones Hospital Universitario Austral

Las infecciones asociadas al cuidado de la salud continúan representando un grave problema a nivel mundial vinculado a la seguridad de atención médica. Recientemente la implementación de medidas basadas en la mejor evidencia disponible ha permitido reducir en forma significativa la tasa de este tipo de eventos. Al mismo tiempo, la introducción de medidas complementarias como la higiene de manos, el aislamiento de contacto, la efectiva limpieza del entorno del paciente y los programas para la gestión del uso de antimicrobianos han mostrado un impacto favorable en el control de la emergencia y transmisión de microorganismos multirresistentes. Finalmente estudios económicos han podido avalar la costo-utilidad de estas intervenciones. Sólo la articulación continua de estas estrategias permite asegurar un adecuado nivel de calidad y seguridad asistencial.

Infección hospitalaria y multirresistencia ¿Un problema a resolver en forma interdisciplinaria e interinstitucional?

Dr. Guillermo R. Lossa

Doctor en Medicina.

Especialista en Administración Hospitalaria. Especialista consultor en Infectología. Máster en Microbiología Clínica y Sanitaria. Académico Correspondiente de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

Creador del Programa Nacional VIH/D

grlossa@hotmail.com, grlossa@intramed.net; guillermo@lossa.com.ar Te: +54-223-4720077 Móvil 5492235062923

En un individuo de 70 Kg, el componente microbiano representa 1,25 Kg. El número de células microbianas (10^{14}) es 10 veces superior al de células humanas del organismo (10^{13})

Existe un continuo flujo e intercambio de bacterias resistentes y de genes de resistencia entre humanos, animales, medio, etc.

La Infección Hospitalaria (IH) es una afección endemo epidémica de los hospitales que existe desde la creación de los mismos, es controlable pero difícilmente erradicable, el riesgo puede estar en el mismo paciente y en factores del entorno (equipos, aire, agua, vectores, manos del personal, manejo de excretas y secreciones, etc.

La IH puede afectar entre un 3 y 20 % de los pacientes que se hospitalizan dependiendo de las condiciones de los pacientes y de las características del hospital en que se internen.

En Argentina uno de cada 10 adultos y uno de cada 20 niños que se internan tiene riesgo de adquirir una IH.

Las Neumonías asociadas a Asistencia Respiratoria Mecánica (14,1 a 17,3 %) constituyen un verdadero problema por lo elevado de las tasas.

Los agentes causales más frecuentes *Acinetobacter baumannii* y otras especies, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Klebsiella pneumoniae*. La resistencia de *Acinetobacter* a Imipenem supera el 85% de las cepas estudiadas y el 60% de los *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina.

La resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos está directamente relacionada al manejo inadecuado de los mismos, tal como lo advirtiera Alexander Fleming en 1945.

La OMS insiste en la urgente necesidad de cambios de conducta respecto a la prescripción de antimicrobianos tanto en humanos como en veterinaria.

Se proponen solución al problema de la Multirresistencia relacionadas fundamentalmente con educación y cambios de conductas.

Metalo-beta-lactamasas: ¿Resistencia todo terreno?

¿Podemos detenerlas?

Alejandro J. Vila, IBR (CONICET- UNR) Rosario, Argentina.

Las β -lactamasas representan el mecanismo de resistencia prevalente frente a los antibióticos β -lactámicos. En la última década, la difusión de los genes que codifican para metalo- β -lactamasas (MBLs) se ha convertido en un problema clínico creciente, potenciado en los últimos años por la diseminación de genes codificando para las enzimas de familias VIM, IMP y (sobre todo) NDM. Las MBLs son enzimas dependientes de zinc. El crecimiento exponencial de las secuencias de MBLs ha revelado una diversidad estructural inédita, que ha llevado que las mismas se clasifiquen en tres clases: B1, B2 y B3, cada una de ellas con diferentes sitios activos.¹

Nuestro grupo ha estudiado MBLs de diferentes subclases con el objetivo de encontrar las características estructurales y catalíticas comunes. Mediante un enfoque multidisciplinario, hemos logrado proponer un mecanismo común a enzimas de todas estas subclases, independientemente de su diversidad estructural.^{2-5,10,11}

También hemos usado la técnica de evolución dirigida como herramienta de ingeniería proteica para explorar los caminos evolutivos de MBLs frente a distintos desafíos. En experimentos de evolución in vitro sobre BclI con una cefalosporina, logramos potenciar la actividad de esta enzima obteniendo una nueva variante con un espectro ampliado.^{7,8} Las mutaciones que dan lugar a estos efectos replican los que se encuentran en MBLs de bacterias patógenas, y están relacionadas con los ligandos fuera del sitio activo de la enzima. Por otra parte, se encontró que la unión de zinc es limitante en el periplasma bacteriano para conferir resistencia, lo que brinda nuevas perspectivas para el diseño de inhibidores.⁹

Referencias

1. M. W. Crowder, J. Spencer and A.J.Vila *Acc. Chem. Res.*, 2006, **39**, 721.
2. Llarrull et al. *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 18276.
3. Morán-Barrio et al. *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 18286.
4. Llarrull et al. *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 30586.
5. Tioni et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15852.
6. Llarrull et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15842.
7. Tomatis et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**, 13761.
8. Tomatis et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**, 20605.
9. Gonzalez et al. *Nature Chem. Biol.*, 2012, **8**, 698.

POSTERS

Caracterización cinética y estructural de la variante natural D240G CTX-M-96

B. Ghiglione¹, M. M. Rodríguez¹, R. Herman², F. Bouillenne², N. Urtasun³, M. Galleni², P. Charlier², G. Gutkind¹, E. Sauvage², P. Power¹

¹Lab. de Resistencia Bacteriana, Fac. de Farmacia y Bioquímica; y ³Cát. de Microbiología Industrial y Biotecnología, UBA, Argentina; ²Centre d'Ingénierie des Protéines, Université de Liège, Belgium.

Antecedentes: La diversificación de la familia CTX-M dio lugar al surgimiento de mutantes cuya expresión se asocia a menor sensibilidad a ceftazidima, siendo la mutación D240G la más frecuente entre las variantes conocidas como "ceftazidimasas". La presencia del residuo de glicina en posición 240 otorgaría mayor flexibilidad a la cadena β 3, favoreciendo el acceso de sustratos voluminosos como la ceftazidima al sitio activo.

Objetivos: Emplear la estructuración de alta resolución de la mutante natural D240G CTX-M-96 para estudiar el papel de residuos en la posición 240 y otras posiciones en la actividad enzimática hacia oximino-cefalosporinas (OC). Analizar el comportamiento cinético de CTX-M-96 y relacionar los parámetros obtenidos con la estructura cristalográfica.

Métodos: Se purificó CTX-M-96 hasta homogeneidad por cromatografía convencional. Los ensayos cinéticos frente a OC se realizaron en condiciones de estado estacionario y se determinaron las constantes de Michaelis-Menten. Se obtuvieron cristales de CTX-M-96 por difusión de vapor de gota colgante a 20 °C. Se realizó difracción de rayos X (sincrotrón Soleil, París, Francia), en condiciones criogénicas (100K). La indexación / integración y ampliación de los datos de intensidad se realizaron con XDS y XSCALE, respectivamente, y la estructura se obtuvo por reemplazo molecular y refinamiento con REFMAC5, TLS, y Coot.

Resultados: CTX-M-96 mostró alta eficiencia catalítica hacia la mayoría de los β -lactámicos. A pesar de la mutación D240G, k_{cat}/K_m de cefotaxima fue 100 veces mayor que la correspondiente a ceftazidima. La estructura de CTX-M-96 se refinó a 1,2 Å (Rlibre: 16,7%). En comparación con otras CTX-M, presentó diferencias en la disposición de estructuras secundarias específicas (av. rmsd: 0,6-1,4 Å) y residuos cuyas cadenas laterales apuntan a direcciones opuestas. En residuos específicos, un cambio de ca. 0,7 Å podría estar asociado a la unión de algunas OC al sitio activo.

Conclusiones: Las diferencias estructurales no bastarían para explicar el comportamiento "ceftazidimasa". La baja eficiencia hidrolítica frente a ceftazidima sugiere que los mayores niveles de resistencia frente a este antibiótico podrían deberse a una combinación de mecanismos.

Disminución de la actividad de tigeciclina frente a aislamientos de *Acinetobacter* spp resistentes a los carbapenemes

Rodríguez CH., Nastro M., Barberis C., García S., Saposnik E., Vay C., Famiglietti A.

Lab. de Bacteriología Clínica, Dpto. de Bioquímica Clínica, Htal. de Clínicas José de San Martín, Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA Buenos Aires, Argentina. INFIBIOC, UBA

La tigeciclina (TIG) es un nuevo derivado sintético de la minociclina (9-t-butyl-glicilamido derivado).

Objetivo: Evaluar la actividad de tigeciclina frente a aislamientos de *Acinetobacter* spp multiresistentes.

Materiales y métodos: Se determinó la CIM a TIG mediante dilución seriada en agar a 69 aislamientos consecutivos de *Acinetobacter* spp resistentes a carbapenemes aislados de materiales clínicos de pacientes atendidos en el Hospital de Clínicas José de San Martín entre Enero y Junio de 2013. Los aislamientos fueron identificados mediante metodología convencional / o utilizando el equipo MALDI-TOF. La sensibilidad se realizó mediante el equipo automatizado VITEK2.

Resultados: La totalidad de los aislamientos fueron resistentes a ambos carbapenemes, IMI y MER, y a todos los β -lactámicos ensayados ciprofloxacina y TMS. Mientras que la sensibilidad a los aminoglucósidos (AMK y GEN), AMS y MIN fue variable. No se observó resistencia a COL

En 24 aislamientos (35%) se observaron valores de CIM > 2 μ g/ml (14 presentaron CIM > 4 μ g/ml y 10 CIM = 4 μ g/ml), mientras que en los 45 restantes los valores de CIM fueron \leq 2 μ g/ml (7 CIM = 2 μ g/ml; 12 CIM = 1 μ g/ml y 26 CIM \leq 0,5 μ g/ml).

Conclusión: En este primer semestre del año 2013 se observó una disminución notable de la actividad de TIG en *Acinetobacter* spp. Resistentes a los carbapenemes, alcanzando en el 35 % de los aislamientos CIM mayores a 2 μ g/ml, tanto en aquellas cepas resistentes como sensibles a minociclina. Estos valores son mucho más elevados a los informados en estudios anteriores a pesar de que no se ha incrementado en forma significativa el uso de TIG en el hospital.

Entorno genético del gen *InuB* en *Streptococcus agalactiae*

Montilla, A.¹; Zavala, A.¹; Caceres, R.²; Cittadini, R.³; Vay, C.^{2,3}; Gutkind, G.¹; Famiglietti, A.²; Bonofiglio, L.¹; Mollerach, M.¹

¹ Cát. de Microbiología. Fac.de Farmacia y Bioquímica. UBA, ² Lab. de Bacteriología Clínica, Htal. de Clínicas José de San Martín, Fac.de Farmacia y Bioquímica, UBA, ³ Sanatorio Mater Dei, CABA, Argentina

Introducción: La resistencia a lincosamidas en *Streptococcus agalactiae* es comúnmente mediada por metilasas codificadas por el gen *erm*, el cual confiere resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B. Previamente reportamos la primera detección en Argentina de un aislamiento de esta especie portador del gen *InuB*.

Durante el periodo de 2007-2012, se recuperaron 8 aislados epidemiológicamente no relacionados de *S. agalactiae* resistentes a clindamicina pero susceptibles a eritromicina (fenotipo L) en dos hospitales diferentes. El objetivo de este estudio fue determinar el entorno genético del gen *InuB* detectado en cepas de *S. agalactiae*, con el fin de conocer el elemento móvil involucrado en la diseminación de este gen de resistencia poco común.

Métodos: Se estudiaron ocho aislados de *S. agalactiae* con fenotipo L, obtenidos de diferentes sitios anatómicos de pacientes de ambos sexos sin nexo epidemiológico. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue determinada en medio sólido siguiendo las recomendaciones del CLSI. Mediante PCR fueron detectados los genes de resistencia *ermB*, *mef* y *InuB*. La relación clonal se determinó por electroforesis de campo pulsado (PFGE) utilizando la enzima *Apal*. Mediante mapeo por Tail-PCR y secuenciación, se realizó el estudio del entorno del gen *InuB*.

Resultados: Los aislamientos fueron susceptibles a eritromicina (CIM =0.01-0.06 mg/L), pero resistentes a clindamicina (CIM = 4-8 mg/L) y todos portaban el gen *InuB*, lo cual se confirmó mediante secuenciación. La genotipificación por PFGE reveló un clon único asociado con este fenotipo. El entorno genético del *InuB* fue secuenciado en la cepa (SGB76), hallándose un elemento de 10,385 kb con alta identidad nucleotídica a la región correspondiente del plásmido pV7037 de *Staphylococcus aureus* SA7037 (9698/9717 99%). Este nuevo elemento que contiene al gen *InuB* está flanqueado por una copia de las transposasas IS1216 e ISL3.

Conclusiones: Este es el primer reporte que a nuestro criterio describe la estructura del elemento que movilizaría el gen *InuB* en *S. agalactiae*, la presencia de dos secuencias de inserción que flanquean dicha estructura, lo cual sugiere que la diseminación de este gen de resistencia podría ocurrir por transferencia horizontal y posiblemente mediada por este elemento. Serán necesarios estudios posteriores para confirmar esta hipótesis.

Estructura cristalográfica de la β -lactamasa de clase A de *Bacillus licheniformis* BS3 inhibida por tazobactam.

Pablo Power¹, Paola Mercuri², Raphaël Herman², Frédéric Kerff², Gabriel Gutkind¹, Moreno Galleni², Paulette Charlier², Eric Sauvage²

(1) Lab. de Resistencia Bacteriana, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina; (2) Centre d'Ingénierie des Protéines, Université de Liège, Belgique.

Introducción: Entre las estrategias para contrarrestar la resistencia a β -lactámicos mediada por β -lactamasas de clase A, varios compuestos capaces de inhibir estas enzimas han sido exitosamente utilizadas en combinación con determinados β -lactámicos. Entre ellos, tazobactam ha demostrado ser el más potente de los inhibidores de β -lactamasas de clase A disponibles para uso clínico.

Algunas evidencias cristalográficas acerca de la interacción de tazobactam con β -lactamasas de clase A como SHV-1 y GES-2 permitieron proponer un modelo de inhibición de varias etapas donde al menos dos intermediarios parecen estar implicados en la inactivación de las enzimas.

Resultados previos nos han demostrado que la β -lactamasa de *B. licheniformis* BS3 presenta un mecanismo de inhibición por clavulánico diferente a otras enzimas de clase A.

Objetivos: Determinar la estructura cristalográfica de la β -lactamasa BS3 en combinación con tazobactam para evaluar si existen diferencias con otras enzimas resueltas, y comparar los mecanismos de inhibición con clavulánico. Finalmente, proponemos un posible mecanismo de inhibición de la β -lactamasa BS3 por tazobactam.

Métodos: La β -lactamasa BS3 fue purificada a homogeneidad y utilizada para obtener cristales por el método de la gota colgante a pH 3,4 y 20°C. El complejo con tazobactam fue obtenido por difusión en los cristales obtenidos a temperatura ambiente. La difracción de rayos X fue realizada en el sincrotrón de Grenoble (Francia) bajo criogénesis (100°K). La indexación e integración de los datos de difracción fueron logradas con Mosflm; el escalado de las intensidades con SCALA (suite CCP4), y el refinamiento de la estructura con REFMAC5, TLS y Coot.

Resultados: La estructura del complejo BS3-tazobactam fue refinada a 2,1Å. De acuerdo a la estructura obtenida, el complejo BS3-tazobactam muestra densidades electrónicas compatibles con al menos una molécula derivada de la hidrólisis de tazobactam: un intermediario trans-enamina de tazobactam covalentemente unido a la serinucleofílica del sitio activo (S70), además estabilizada por puentes hidrógeno con varios residuos del sitio activo y con una molécula de dióxido de carbono.

Conclusiones: En esta estructura, no hemos observado algún residuo derivado de la descarboxilación del tazobactam, indicando que, o bien el complejo permanece en su forma carboxilada, o un paso subsecuente en la reacción de inhibición es aún necesario para la liberación de la forma descarboxilada, y previamente observada en la estructura de BS3-clavulanato. Aunque S130 es usualmente reportado como importante para la descarboxilación, en este caso podría

Comparación de los métodos de difusión y de dilución en agar en *Corynebacterium* spp.

C Barberis, M Almuzara, E Sandoval, T Nuñez Quezada, E Paez Mendieta, A Famiglietti, C Vay
Lab. de Bacteriología. Cát. de Microbiología Clínica. Dpto. de Bioquímica Clínica. Fac. de Farmacia y Bioquímica. Htal. de Clínicas. UBA, Argentina

La incidencia creciente de las infecciones por corinebacterias, el aumento en la resistencia y su emergencia en el medio hospitalario llevan a la necesidad de conocer la sensibilidad antibiótica para implementar el tratamiento adecuado. Sin embargo, la prueba por difusión no ha sido aún estandarizada por normas internacionales.

Objetivo: Conocer la actividad “in vitro” de diferentes antimicrobianos y establecer los puntos de corte para el método de difusión en *Corynebacterium* spp.

La sensibilidad antibiótica fue realizada por dilución en agar (método de referencia) y por difusión, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI, sobre un total de 183 aislados de *Corynebacterium* spp. (143 y 40 aislados pertenecientes a especies no lipofílicas y lipofílicas, respectivamente).

Se ensayaron los siguientes antimicrobianos (ATB): a) Dilución: penicilina (PEN), cefalotina (CEF), cefotaxima (CTX), imipenem (IMP), meropenem (MER), gentamicina (GEN), amicacina (AK), eritromicina (ERI), clindamicina (CLIN), vancomicina (VAN), teicoplanina (TEI), ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TET), moxifloxacina (MOX), minociclina (MIN), levofloxacina (LEV), tigeciclina (TIGE), linezolid (LNZ), trimetoprima sulfametoxazol (TMS) y rifampicina (RA). b) Difusión: PEN, ERI, CC, VAN, GEN, CIP, TMS y MIN.

Los puntos de corte para el método de dilución utilizados fueron: a) *Corynebacterium* spp. (documento M45-P, CLSI), b) *Staphylococcus* spp.: CEF, AK, MIN, LEV y MOX (CLSI), c) *Staphylococcus* spp.: TIGE (FDA).

Para establecer los puntos de corte del método de difusión se utilizó el método de regresión de los cuadrados mínimos y el porcentaje global de errores (error “very mayor” (VM), error “mayor” (M) y error “menor” (MI). Se consideraron como aceptables valores de 1,5 y 3,0 para errores VM y M respectivamente. Se establecieron puntos de corte para aquellos antimicrobianos cuyo coeficiente de correlación lineal de Pearson (r) fue 0,75.

Resultados: Para todas las especies los antibióticos más activos fueron VAN, TEI, TIGE, MIN y LNZ; ERI, CLIN y TMS tuvieron pobre actividad sobre todas las especies ensayadas. Se establecieron puntos de corte en corinebacterias no lipofílicas para: PEN, ERI, CLIN, GEN y CIP. En las especies lipofílicas, los puntos de corte por difusión para PEN, GEN y ERI no pudieron ser establecidos debido al porcentaje de errores inaceptables y sólo pudo establecerse para CIP.

No se obtuvo correlación lineal para VAN, MIN y TMS, lo que impidió establecer puntos de corte.

Conclusiones: El aislamiento de *Corynebacterium* spp. requiere de la prueba individual de sensibilidad pues ésta varía en relación a la especie involucrada.

El método de difusión podría ser utilizado para evaluar la actividad de PEN, ERI, CLIN, GEN y CIP en especies no lipofílicas, y sólo para este último en especies lipofílicas.

Actividad de distintas asociaciones de antimicrobianos frente a enterobacterias productoras de carbapenemasas.

Nastro M., Rodriguez CH., Dabos L., Vay C, Famiglietti A

Lab. de Bacteriología, Dpto. de Bioquímica Clínica, Htal. de Clínicas José de San Martín, Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires, Argentina. INFIBIOC, UBA

Las opciones terapéuticas en enterobacterias productoras de carbapenemasas son escasas. Por ello frecuentemente se recurre al uso de asociaciones de antimicrobianos para su tratamiento.

Objetivo: Evaluar diferentes asociaciones de colistina (COL), tigeciclina (TIG) y meropenem (MER) en enterobacterias resistentes a los carbapenemes.

Materiales y métodos: Se estudiaron en 45 enterobacterias productoras de KPC (39 *K. pneumoniae*, 5 *Enterobacter* spp., 1 *S. marcescens*) aislados de materiales clínicos de pacientes atendidos en el Hospital de Clínicas José de San Martín. El estudio de las diferentes asociaciones se realizó mediante curvas de letalidad y comparación de valores de CIM/CBM en presencia y ausencia de concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano sinérgico. Se ensayaron las siguientes asociaciones (nº de casos):

COL-RIFA (39), COL-TIG (16), COL-CIP (7) COL-GEN (3)

TIG-RIF (9), TIG-AMK (2)

MER-COL (19) y MER-TIG (2)

Resultados: La asociación COL/RIF fue sinérgica en los 19 aislamientos resistentes a COL, mientras que TIG lo fue solo en 2/4 ensayados y CIP en 0/4. En los aislamientos COL sensibles las asociaciones con RIF en 2/20 y TIG en 2/16 fueron sinérgicas. Solo 2/9 aislamientos presentaron sinergia con TIG/RIF (1 sensible y otro resistente a TIG).

En 5/12 aislamientos la asociación COL/MER fueron sinérgicas, mientras que no se observó con MER/TIG

Conclusión: La asociación COL/RIF fue la más activa *in vitro*, y con la que se obtuvieron mejores resultados clínicos, incluso en aquellos pacientes con aislamientos resistentes a ambos antimicrobianos. En los aislamientos COL sensibles no se pudo demostrar sinergia en la mayoría de los casos fundamentalmente a que COL *per se* es bactericida. En cambio, MER sinérgizó solamente en casi la mitad de los aislamientos, independientemente de la resistencia a MER o COL. No se obtuvieron buenos resultados con TIG asociado con RIF o AMK

Análisis *in silico* de genes de resistencia y virulencia en *Inquilinus limosus*.

M Pino¹, G Gutkind¹, J Di Conza^{1,2}

¹ Fac. de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. ² Fac. Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe; Argentina.

Desde que el género *Inquilinus* se caracterizó en 2002, se reportaron casos de infecciones/colonizaciones en pacientes con fibrosis quística (PFQ). Se caracteriza por presentar un perfil de multiresistencia a antimicrobianos y capacidad de persistir en el tracto respiratorio de estos pacientes. El aislamiento a partir de la muestra de esputo es dificultoso, aún cuando con anterioridad de que los cultivos resulten positivos pueda detectarse una respuesta serológica de tipo IgG específica frente a varios antígenos de *Inquilinus*. Aunque el nicho ecológico es desconocido, el análisis filogenético del género *Inquilinus* muestra su estrecha relación con *Azospirillum*, un microorganismo asociado a plantas. El ADNr 16S de *I. limosus* se recuperó de muestras ambientales, lo que sugiere un nicho ecológico ambiental. A fin de dilucidar su rol como patógeno emergente en humanos se procedió a secuenciar y analizar el genoma de la cepa *I. limosus* MP06, recuperado de un PFQ en Santa Fe, Argentina. La secuencia parcial del genoma se obtuvo mediante una estrategia *whole genome sequencing* mediante un pirosecuenciador GS 454 Titanium en INDEAR, Argentina, ensamblado con el software 454 Newbler, v.2.6, con cobertura mayor a 20X. Consistente a lo observado en microorganismos ambientales, el genoma presenta numerosos determinantes de resistencia a compuestos tóxicos. Se detectaron 99 genes posiblemente dedicados al metabolismo del azufre y dos operones de resistencia a arsénico dispersos en el genoma. También muchos determinantes de resistencia a cobre, cobalto, zinc y cadmio. Hasta el momento no se han detectado plásmidos. En el análisis realizado también se encontró un operón de virulencia que podría estar involucrado en la transcripción del ADN y la síntesis de proteínas ribosomales. Este operón, presenta una similitud del 40-50% con el descrito en *Mycobacterium tuberculosis*, el cuál le confiere la capacidad tanto para la invasión y la supervivencia intracelular en los macrófagos. También están presentes los genes que participan en el mecanismo reparador de ADN, altamente mutagénico, conocido como mecanismo de unión de extremos no homólogos (*Non-homologous DNA End Joining*), similar al que permite a las micobacterias evadir la defensa genotóxica del huésped. La descripción, comprensión y posterior evaluación de los genes o rutas implicadas en la virulencia y/o la defensa del microorganismo podrían explicar la capacidad de *I. limosus* para comportarse como patógeno oportunista emergente y persistir en las vías respiratorias de PFQ.

Evaluación de los resultados de un corte de prevalencia de bacilos gram- negativos multirresistentes en un hospital universitario

Nastro M¹, Mainetti P¹, Dabos L¹, Saposnik E¹, Altube A¹, Losada M¹, Di Gregorio S², Foccoli M², Vay C¹, Rodriguez Ch¹, Famiglietti A¹.

¹Lab. de Bacteriología Clínica, Dpto. de Bioquímica Clínica, Htal. de Clínicas José de San Martín, Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires, Argentina. INFIBIOC, UBA ²División Infectología. Htal. de Clínicas José de San Martín.

Introducción: El estudio de portación de bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenemes (BGNRC) representa una herramienta útil en el control de IH.

Objetivos: Evaluar la portación intestinal de BGNRC en un hospital universitario.

Materiales y métodos: El 7 de agosto de 2012 se investigó la portación de BGNRC mediante hisopado perianal a los 168 pacientes internados en el Hospital de Clínicas José de San Martín. Los hisopados fueron sembrados en medio CHROMagar KPC, se realizó detección fenotípica de resistencia a carbapenemes mediante KPC + MBL confirmID Pack (Rosco), y confirmación genotípica y de similitud entre los aislamientos mediante PCR. Los posibles factores de riesgo asociados a la portación se analizaron estadísticamente mediante el software Graph Pad Prism versión 6.01.

Resultados: Se detectaron 35 pacientes colonizados con BGNRC (20.8%), 11 con enterobacterias (ENT) (6.5%), 13 con *Acinetobacter* spp. (7.7 %) y 5 con *Pseudomonas aeruginosa* (3%), los 6 pacientes restantes presentaron colonización mixta (3.6%).

13/17 ENT fueron portadoras de KPC-2 (11 *Klebsiella pneumoniae* indistinguibles genotípicamente, y 2 *Enterobacter cloacae*), 3 *Kp* fueron OXA-163(+) y el restante aislamiento no fue productor de carbapenemasa. La unidad de cuidados intensivos (UCI) representó la sala con mayor porcentaje de colonización (p 0.008). La internación previa de entre 5 y 10 días (p 0.005) y el uso previo de carbapenemes (CAR) (p 0.005) y vancomicina (VAN) (p 0.003) fueron factores estadísticamente significativos.

Todos los aislamientos de *Acinetobacter* spp (18) fueron productores de OXA-23. Se detectó la presencia de dos clones. El principal factor de riesgo fue la estadía en UCI (p 0.026). Al igual que en las ENT, el uso previo de CAR (p 0.0023) y VAN (p 0.0008) se observó en pacientes colonizados por *Acinetobacter* spp RC. El tiempo de internación previo fue > que en ENT (>14 días) (p 0.0043).

P. aeruginosa RC se recuperó sólo en 6 pacientes con estadía mayor a 14 días y tratamiento previo con CAR, VAN y colistin. Sólo 1/6 aislamientos fue portador de carbapenemasa (VIM).

Conclusiones: La internación en UCI, la estadía previa prolongada y el uso previo de antibióticos resultaron los factores de riesgo asociados. En *K. pneumoniae* KPC observamos la diseminación del clon epidémico y en *Acinetobacter* spp la colonización por aislamientos productores de enzimas tipo OXA pertenecientes a los clones endémicos del hospital

Caracterización cinética de una metalo-β-lactamasa (LRA-12) proveniente del metagenoma ambiental de suelos de Alaska.

M. M. Rodríguez¹, B. Ghiglione¹, J. Di Conza¹, L. Moe², M. Pérez Garófalo¹, E. Blatezky¹, F. Wolman³, J. Handelsman⁴, G. Gutkind¹, P. Power¹

⁽¹⁾Lab.de Resistencia Bacteriana, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina; ⁽²⁾ Department of Plant&SoilSciences, University of Kentucky, USA; ⁽³⁾ Cát. de Biotecnología, Fac.de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina; ⁽⁴⁾ Department of Molecular, Cellular and DevelopmentalBiology, Yale University, USA.

La metagenómica incluye una serie de metodologías destinadas a la recuperación directa de genes o proteínas a partir de microorganismos no cultivables, comprendiendo generalmente la obtención de genotecas en *Escherichiacoli*, y evitando el uso de técnicas de cultivo. De esta manera, varios genes de resistencia a antibióticos provenientes del metagenoma ambiental han sido descubiertos en muestras de suelo de Alaska, como genes codificantes de β-lactamasas de las cuatro clases moleculares según Ambler. En este trabajo, nos hemos enfocado en el análisis fenotípico y bioquímico (propiedades cinéticas) de una metalo-β-lactamasa (MBL) de clase B3, denominada LRA-12, previamente aislada de una muestra de suelo de Alaska.

El gen *bla*_{LRA-12} fue clonado en vectores apropiados para evaluar el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos en *E. coli*, de acuerdo a las recomendaciones de CLSI. LRA-12 fue además producida a partir de sistemas de sobre-expresión, y la MBL fue purificada hasta homogeneidad por cromatografía de afinidad por níquel e intercambio iónico. Los parámetros cinéticos en el estado estacionario (*steady-state*) fueron determinados para antibióticos β-lactámicos, y las constantes de inhibición por ensayos competitivos para inhibidores.

LRA-12 posee 61% de identidad aminoacídica con las MBL de la familia GOB provenientes de *Elizabethkingiameningoseptica*. Además, mostró un 41% y 33% de identidad con FEZ-1 (*Fluoribactergormanii*) y BJP-1 (*Bradyrhizobiumjaponicum*), respectivamente, dos enzimas de clase B3 cuyas estructuras cristalográficas fueron previamente resueltas. Los clones productores de LRA-12 fueron resistentes a todos los β-lactámicos ensayados, excepto aztreonam, y mostraron inhibición por EDTA. La enzima purificada mostró eficiencias catalíticas elevadas hacia la mayoría de los β-lactámicos excepto monobactámicos (que se comportaron como inhibidores), de acuerdo al comportamiento esperado para una MBL.

Los resultados respaldan la hipótesis acerca del origen de muchas β-lactamasas que residen en los genomas bacterianos de especies ambientales. Estas β-lactamasas pueden poseer una actividad nativa de amplio espectro compatible con las enzimas presentes en patógenos clínicos, y sus genes codificantes, de ser reclutadas por elementos de diseminación, podrían ser transferidas a bacterias asociadas al hombre y producir enzimas que directamente otorguen un perfil de resistencia elevada.

***Nocardia* spp.: Identificación, sensibilidad antibiótica y correlación difusión-dilución**

L Musto¹, G Guzman¹, C Barberis¹, A Famiglietti¹, MS Ramirez², C Vay¹, M Almuzara¹
 1 Lab de Bacteriología. Cát. de Microbiología Clínica. Dpto. de Bioquímica Clínica. Fac. de Farmacia y Bioquímica. Htal. de Clínicas. UBA, Argentina. ² Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM, UBA-CONICET), Fac. de Medicina, UBA, Argentina

Nocardia spp. son bacterias aerobias, Gram positivas, ácido resistentes que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente y pueden infectar principalmente a personas inmunocomprometidas. La identificación fenotípica a nivel de especie es dificultosa. La importancia de alcanzar la identificación definitiva radica en que está estrechamente relacionada con el perfil de sensibilidad antibiótica lo que define el tratamiento en cada caso. En este contexto, el CLSI ha establecido puntos de corte para el método de dilución, pero no así para el método de difusión, este último más fácilmente aplicable en los laboratorios de microbiología clínica.

En este estudio, un total de 53 aislados de *Nocardia* spp. obtenidos a partir de diferentes especímenes clínicos se identificaron siguiendo el esquema fenotípico de Wallace y por secuenciación del gen RNA ribosomal 16S (método de referencia).

Se realizó la sensibilidad antibiótica mediante el método de microdilución (CLSI) y por el método de difusión a fin de establecer una correlación entre ambas técnicas y eventualmente fijar puntos de corte para este último. Se ensayaron los siguientes antibióticos: amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ceftriaxona (CRO), imipenem (IMI), amikacina (AK), minociclina (MIN), ciprofloxacina (CIP), trimetoprima/sulfametoxazol (TMS), eritromicina (ERI) y linezolid (LZD). La correlación entre ambas metodologías se llevó a cabo por el método de regresión de los cuadrados mínimos y el porcentaje global de errores de acuerdo a las recomendaciones del CLSI, aplicando el programa Statistica 6.0. Las especies halladas fueron: 16 *N. cyriacigeorgica*, 15 *N. brasiliensis*, 13 *N. farcinica*, 2 *N. abscessus*, 2 *N. exalbida*, 1 *N. arthritis*, 1 *N. nova*, 1 *N. otitidiscaviarum*, 1 *N. takedensis* y 1 *N. beijingensis*. Todos los aislados fueron sensibles a amikacina, minociclina y linezolid. TMS no fue activo frente a *N. farcinica*, *N. otitidiscaviarum* y *N. nova*. AMC y CIP presentaron actividad variable. ERI solo fue activa sobre el único aislado de *N. nova* ensayado. Un alto % de aislamientos de *N. brasiliensis* y los aislados ensayados de *N. abscessus*, *N. otitidiscaviarum*, *N. exalbida* y *N. beijingensis* fueron resistentes a IMI. Se logró determinar una correlación lineal entre el método de difusión y la microdilución para AMC, CRO, IMI y CIP y establecer puntos de corte para los 3 primeros (mm): AMC: Resistente (R) ≤ 9, Intermedio (I): 10-22, Sensible (S) ≥ 23; CRO: S ≥ 24; IMI: R: ≤ 9, I: 10-21, S: ≥ 22.

La secuenciación del gen RNA ribosomal 16S permitió reconocer especies infrecuentes de *Nocardia* en la infección humana. La resistencia a TMS y a imipenem pareciera estar relacionada con algunas especies y limita su uso en las infecciones por ellas ocasionadas.

Destacamos la necesidad de efectuar la prueba de sensibilidad antibiótica para cada aislado en virtud de la resistencia observada.

Utilidad de genes *bla*_{OXA} como marcador de especie en *Achromobacterspp.*

Papalia M¹, Traglia GM², Almuzara M³, Gonzalez A.J¹, Gallego A¹, Korol S¹, Centron M², Gutkind G¹, Vay C³, Ramírez MS², Radice M¹

1 Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA2 IMPaM, UBA-CONICET 3 Hospital de Clínicas, FFyB, UBA

Introducción: Las bacterias del género *Achromobacter* pueden asociarse a neumonía, bacteriemia e incluso meningitis en pacientes inmunodeprimidos, si bien también se han descrito en pacientes inmunocompetentes. Recientemente ha sido reportada la presencia del gen *bla*_{OXA-114} en el cromosoma de *A. xylosoxidans*, y su detección por PCR ha sido propuesta como un marcador molecular para la identificación de esta especie. Dado que la identificación de especies del género *Achromobacter* es dificultosa, se evaluó la capacidad de diferentes técnicas fenotípicas y genotípicas para lograr la correcta identificación de especies distintas de *A. xylosoxidans*.

Materiales y métodos: Se incluyeron en el estudio 29 aislamientos del género *Achromobacter*. Se llevó a cabo la identificación por pruebas bioquímicas convencionales (Yabuuchi *et al.*, 1981; Vandame *et al.*, 2012), por secuenciación del gen codificante del ARNr 16S y por el esquema de MLST (multilocus sequence typing) descrito recientemente por Spilker *et al.*, 2012. La detección del gen codificante de la enzima OXA-114 se realizó por amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos descritos por Turton *et al.*, 2011. Se secuenciaron los amplicones y la secuencia de nucleótidos se comparó con las distintas variantes alélicas de *bla*_{OXA-114} depositadas en el GenBank. Se aplicaron diferentes algoritmos filogenéticos por máxima verosimilitud y el método de distancias.

Resultados: El análisis de las secuencias del gen ARNr 16S mostró, en todos los casos, más de un 99% de identidad con las secuencias depositadas en base de datos para varias especies de *Achromobacter*. Diecinueve aislamientos fueron identificados como *A. xylosoxidans* por pruebas bioquímicas, mientras que en los restantes los resultados no fueron concluyentes. En todos los aislamientos la amplificación del gen resultó positiva. En los aislamientos identificados como *A. xylosoxidans*, la secuencia nucleotídica del fragmento amplificado de *bla*_{OXA-114} mostró 98-100% identidad con las distintas variantes alélicas depositadas en base de datos, identificándose incluso una nueva variante. No obstante, las secuencias nucleotídicas de los otros 10 aislamientos presentaron menos del 90 % de identidad respecto de *bla*_{OXA-114}, correspondiendo a nuevas enzimas de tipo OXA. Los perfiles alélicos y secuenciotipos (ST) para estos 10 aislamientos fueron asignados de acuerdo a <http://pubmlst.org/achromobacter/>: 5 aislamientos correspondieron a *A. ruhlandii* ST 148 (4) y ST 43 (1), 2 aislamientos correspondieron a genogrupo 2b ST 164, 1 aislamiento a genogrupo 14 ST 165 y 2 a ST aún no definidos.

Conclusión: la identificación de las distintas especies de *Achromobacter* resulta compleja y en muchas ocasiones lleva a resultados confusos. Es por ello que consideramos que la posibilidad de contar con los genes *bla*_{OXA} como marcador molecular de especie constituiría una herramienta útil en su identificación.

Estructura cristalográfica de la β -lactamasa PER-2: evidencias del papel de R220 en la interacción con β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas.

M. Ruggiero¹, E. Sauvage², R. Herman², F. Sapunarić², M. Galleni², G. Gutkind¹, P. Charlier², P. Power¹

¹Lab. de Resistencia Bacteriana, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA Junin 956 (1113), Buenos Aires, Argentina; ²Centre d'Ingénierie des Protéines, Université de Liège, B-4000 Sart Tilman, Liège, Belgium.

Introducción: La estructura cristalográfica de PER-1 previamente resuelta revela un plegamiento diferente del Ω loop y un plegamiento nuevo de la cadena B3, provocando un bolsillo catalítico más amplio en el cual se pueden acomodar más eficientemente los sustituyentes voluminosos de las oximino-cefalosporinas. A partir de modelados moleculares teóricos, hemos observado que mutaciones en R220 de PER-2 parecen ser equivalentes a mutaciones en R244 de las variantes de IR-TEM, probablemente influyendo en la susceptibilidad a la inhibición y un cambio en el perfil de hidrólisis de sustratos. En este trabajo hemos determinado la estructura cristalográfica de PER-2, y evaluamos el posible rol de la R220 en la estructura y en la actividad frente a los β -lactámicos y los inhibidores.

Métodos: PER-2 fue purificada a homogeneidad por técnicas de cromatografía convencionales. Los cristales fueron obtenidos con el método de la gota colgante a 20°C. La difracción de rayos X fue realizada en el sincrotrón Soleil (Paris, France) bajo condiciones criogénicas (100oK). La indexación/integración de los datos colectados fue realizada con XDS, y el escalado de las intensidades con XSCALE. La estructura fue obtenida y refinada por reemplazo molecular, utilizando REFMAC5, TLS y Coot. Los modelos fueron obtenidos con Coot y PyMol. Los parámetros cinéticos fueron determinados en condiciones de estado estacionario, y los parámetros de inhibición por ensayos competitivos.

Resultados: La estructura de PER-2 fue refinada a 2,10Å. En PER-2, la cadena B3 está desplazada unos 5 Å hacia el bolsillo catalítico en comparación con otras β -lactamasas de clase A, creando un ambiente aparentemente más favorable para la estabilización de moléculas como las oximino-cefalosporinas a través de puentes de hidrógeno. Esta cadena, además, parece estar estabilizada por puentes de hidrógeno entre T237 y R220. De acuerdo con modelos simulados de la enzima salvaje y de mutantes en R220, el ambiente de los residuos en la posición 220 parece influir tanto en la inhibición por inhibidores "suicidas" como en la actividad catalítica frente a distintos sustratos. Los parámetros cinéticos apoyan este comportamiento, especialmente para algunos sustratos, para los cuales los valores aumentados de Km acompañados de valores de kcat disminuidos provocan valores de kcat/Km 10 veces menores..

Conclusiones: Las evidencias estructurales sugieren que la interacción de las diferentes moléculas de β -lactámicos con la red de puentes de hidrógeno asociados con los residuos del complejo de coordinación de la reacción está estabilizada por residuos de aminoácidos específicos, siendo R220 un residuo importante para la actividad frente a cefalosporinas y probablemente los inhibidores "suicidas". La estabilidad global de las mutantes R220 que acompaña su comportamiento cinético, sugiere que estas variantes podrían ser seleccionadas in vivo.

Diseminación de *Pseudomonas aeruginosa* ST 654 productora de KPC en hospitales de Buenos Aires

L. Dabos¹, M. Papalia¹, R. Cittadini², J. Kovensky P.³, M. Almuzara¹, M. Nastro¹, G. Santella¹, C. Mainetti¹, H. Rodríguez¹, C. Vera Ocampo², M. Del Castillo², R. Bucca³, G. Snitman³, V. Menéndez³, M. Mastroberti³, D. Cejas¹, A. Famiglietti¹, G. Gutkind¹, C. Vay^{1,2}, M. Radice¹

¹. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina; ². Sanatorio Mater Dei, CABA, Argentina;

³. Hospital Municipal de Quemados, CABA, Argentina

Introducción: Las carbapenemasas de tipo KPC son enzimas de clase A que confieren resistencia a todos los β-lactámicos incluyendo los carbapenemes. Este marcador de resistencia se encuentra ampliamente diseminado en *Klebsiella pneumoniae* en nuestra región, correspondiendo mayoritariamente al secuenciotipo (ST) 258. Por su parte, KPC-2 en *P. aeruginosa* fue descrita inicialmente en nuestro país, en Bariloche en 2008. Son escasos los reportes de este marcador de resistencia en dicha especie y algunos estudios muestran que los aislamientos de *P. aeruginosa* productora de KPC no corresponden a la diseminación de un clon mayoritario (Cuzon et al, 2011)

Objetivo: Caracterizar aislamientos de *P. aeruginosa* productores de KPC provenientes de distintos hospitales de la Ciudad de Buenos Aires, analizar su posible relación clonal y la diseminación de algunos clones prevalentes.

Materiales y métodos: Se estudiaron 12 aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a meropenem e imipenem sospechosos de producir enzimas de tipo KPC. La sensibilidad a los antibióticos se determinó por difusión en agar según CLSI y siguiendo las recomendaciones de la AAM. Se realizó el **screening** de carbapenemasas de tipo KPC con discos conteniendo ácido borónico (300μg) (APB) y de metalo-β-lactamasas (MBL) con EDTA (1 μmol). Se llevó a cabo la amplificación del gen codificante de KPC por PCR, utilizando cebadores específicos. Para los ensayos de clonalidad se realizó PFGE del ADN genómico digerido con la enzima XbaI según Tsakris et al, 2000. Se determinó el ST según www.pubmlst.org/paeruginosa.

Resultados: Los 12 aislamientos fueron resistentes a ceftadima, cefepime, piperacilina, piperacilina-tazobactama, imipenem, meropenem, ciprofloxacina y azteonam; y fueron sensibles a colistin. El **screening** de MBL fue negativo en los todos aislamientos mientras que el ensayo de sinergia con APB fue positivo en cada uno de ellos. A su vez la amplificación del gen codificante de KPC por PCR arrojó resultados positivos en los 12 aislamientos. Los patrones de bandas obtenidos por PFGE en 10 de los aislamientos fueron indistinguibles y su ST correspondió al ST 654, coincidente con el hallado en Bariloche en el año 2008. De los restantes, 1 correspondió también al ST 654 y el otro al ST 683.

Conclusiones: La presencia del gen codificante de KPC en *P. aeruginosa* plantea un serio desafío terapéutico frente a infecciones causadas por este microorganismo y resalta la importancia de mantener adecuadas conductas sobre el control de las infecciones, destinadas a evitar la diseminación de los patógenos así como de los marcadores de resistencia. Además la posible relación entre estos aislamientos con los reportados en Bariloche en 2008, alerta sobre la presencia de un clon circulante en nuestro medio.

Resistencia a quinolonas mediada por plasmidos (PMQR) en *Enterobacteriaceae* en Argentina y Perú.

G Rincón^{1,2}, J Di Conza^{1,3}, M Radice¹, G Gutkind¹

¹ Fac. de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. ² Universidad Industrial de Santander, Colombia. ³ Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

Introducción: A partir del 1998 se reportaron marcadores de resistencia a quinolonas codificados en plásmidos como la variante de la enzima acetiltransferasa de aminoglicósidos (AAC(6')-Ib-cr), las bombas de eflujo (QepA y OqxAB) y las proteínas tipo Qnr. A pesar de los elevados reportes de resistencia a quinolonas, son escasos los estudios realizados en Sudamérica.

El objetivo del trabajo fue determinar la frecuencia de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA* y *oqxB* en aislamientos resistentes a cefalosporinas de tercera generación (C3G) productores de β-lactamasa de espectro extendido (BLEE).

Materiales y métodos: Se han estudiado 77 **enterobacterias** productoras de BLEE recolectadas en 15 hospitales de Argentina durante la primera semana de octubre del 2010 (50 aislamientos) y en Lima, Perú, en enero del 2011 (27 aislamientos). La caracterización de los genes PMQRse realizó por amplificación por PCR y posterior secuenciación.

Resultados: De los 50 aislamientos provenientes de Argentina, 22 fueron *Klebsiella pneumoniae*, 14 *Escherichia coli*, 5 *Proteus mirabilis*, 4 *Klebsiella oxytoca*, 3 *Serratia* spp., 1 *Enterobacter* sp. y 1 *Providencia* sp. El alelo de *qnrB* (n=19) con mayor frecuencia hallado en este grupo fue *qnrB2* (8), seguido de *qnrB19* (6), *qnrB10* (3), *qnrB1* (1) y *qnrB6* (1). No se detectó la presencia de *qnrA*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *oqxA*, *oqxB* y *qepA*. El gen *aac(6')-Ib* se detectó por PCR en 76,3% (42/55) y de ellos, 52,3% (22/42) correspondió a *aac(6')-Ib-cr*. Uno de los 42 aislamientos positivos fue heterocigoto para el gen *aac(6')-Ib* y su variante *aac(6')-Ib-cr*.

Por otra parte de los 27 aislamientos productores de BLEE provenientes de Perú, 15 fueron *E. coli*, 9 *K. pneumoniae* y 3 de otras especies. El mecanismo PMQR prevalente fue *aac(6')-Ib-cr* (15/27). En cinco aislamientos (18,5%) se detectaron genes tipo *qnr*: *qnrB19* (3), *qnrB1* (1) y *qnrS1* (1). Los genes codificantes para la bomba de eflujo OqxAB fueron encontrados en tres aislamientos de *E. coli* donde uno de ellos adicionalmente portaba el gen *aac(6')-Ib-cr*. Finalmente *qepA1* fue detectado en un aislamiento de *E. coli*.

Conclusiones: En ambos países de Sudamérica, se observa como el principal mecanismo de resistencia *aac(6')-Ib-cr* asociado a *bla_{CTX-M}* grupo 1, concordante a lo reportado en otros estudios. Sin embargo, la presencia de mecanismos de eflujo *oqxA*, *oqxB* y *qepA1* fue detectada sólo en aislamientos clínicos de Perú.

Detección de heteroresistencia a vancomicina en bacteriemias por *Staphylococcus aureus*

S Di Gregorio¹, B Perazzi², A Ordoñez Martínez², CH Rodriguez², C Barberis², C Vay², M Mollerach¹, A Famiglietti²

¹ Cát.de Microbiología, Fac.de Farmacia y Bioquímica, UBA, CABA, Argentina. ² Lab.de Bacteriología Clínica, Htal.de Clínicas José de San Martín, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA, CABA, Argentina

El objetivo de este trabajo fue conocer la frecuencia de aislamientos de *S. aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA) y aquellos con resistencia heterogénea (hVISA), evaluar diferentes metodologías para su detección y analizar las características genotípicas de los mismos.

Se estudiaron todos los aislamientos de *S. aureus* provenientes de hemocultivos durante el período 1-08-2009 al 06-11-2010 en el Hospital de Clínicas José de San Martín. Inicialmente se analizó un aislamiento por paciente, pero en casos de bacteriemias múltiples se estudiaron además los aislamientos adicionales. En aquellos aislamientos SAMR se realizó la detección de los genes *mecA* y *luk-PV*, caracterización del *SCCmec* y genotipificación del locus *agr* mediante reacciones de PCR. Se determinó la CIM de vancomicina (VAN) y teicoplanina (TEI) por dilución en agar y Etest de VAN. Para la detección de hVISA se utilizaron las siguientes metodologías: MacroEtest de VAN, placas de screening de: BHI con 3, 4, 5 µg/ml de VAN (BHIV3, BHIV4, BHIV5 y BHIV6), MHA con 5µg/ml de TEI (MHAT5), y la predifusión con tabletas de VAN y TEI. Se consideraron probables hVISA aquellos aislamientos que por al menos 2 de estos métodos dieron positivo (BHIV3, BHIV4, BHIV5, BHIV6 y MHAT5 desarrollo a las 48 h, MacroEtest VAN >4µg/ml, predifusión VAN ≤22mm y /o TEI <20mm). Posteriormente fueron confirmados mediante el método de análisis poblacional y área bajo la curva (PAP-AUC).

Todos los aislamientos fueron sensibles a VAN (CIM ≤2µg/ml) por dilución en agar y Etest y a TEI (CIM ≤4µg/ml). Once de los 104 aislamientos de *S. aureus* resultaron probables hVISA y solo 3 fueron confirmados (PAP-AUC/PAP-AUC de Mu3 ≥0.9), lo que representa el 3,3% de los pacientes con bacteriemias en el período de estudio. Veintisiete aislamientos desarrollaron en al menos 1 placa de screening (19 en MHAT5, 15 EN BHIV3, 2 en BHIV4). La técnica de Macro Etest fue capaz de detectar a los 3 hVISA, mientras que el método de predifusión detectó 4 aislamientos de los cuales solo 2 fueron confirmados. Los 3 hVISA presentaron valores de CIM por Etest >1 µg/ml.

No se encontraron aislamientos VISA y los hVISA fueron poco frecuentes y genéticamente no relacionados. Las placas de screening no resultaron de utilidad para la detección de hVISA, mientras que la combinación de E-test VAN >1µg/ml, macro E-test ≥6µg/ml y predifusión VAN o TEI, alertaría frente a la presencia de un probable hVISA el cual requeriría una posterior confirmación.

Caracterización del primer aislamiento de *Salmonella* Heidelberg productor de CMY-2 en Argentina

D. Cejas¹, M. Quinteros³, R. Vignoli², N. Cordeiro², R Callejo³, J Videla³, R Marino³, R Cabrera³, G. Gutkind¹, M. Radice¹.

¹ Facultad de Farmacia, UBA, Argentina ² Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay ³ Hospital F. J. Muñiz.

Introducción: *S. enterica* serovar Heidelberg constituye una de las principales causas de salmonelosis en humanos en EEUU y Canadá, sin embargo resulta infrecuente en Sudamérica y Europa. A su vez, en la última década se ha reportado un incremento en los niveles de resistencia a oximiinocefalosporinas, en los países de América del Norte. Este incremento se asocia principalmente a la diseminación de la β-lactamasas de tipo AmpC plasmídica CMY-2. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la resistencia a antibióticos β-lactámicos en un aislamiento *S. entérica*.

Metodología: El aislamiento fue recuperado en febrero del año 2012 en un paciente de 30 años, en situación de calle, el cual padecía de tuberculosis miliar y era VIH positivo. El mismo consultó por una diarrea de 3 días de evolución. La serotipificación del aislamiento fue realizada en el Centro Nacional de Salmonella (CNS) en Montevideo, Uruguay, la cual fue positiva para el serovar Heidelberg. Se determinó la sensibilidad a distintos antibióticos por dilución en medio líquido de acuerdo al CLSI, resultando resistente a ampicilina, amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefalotina, cefoxitina y ceftacidima; sensible a cefepime, imipenem, meropenem, ampicilina, ácido nalidíxico y ciprofloxacina; y presentó sensibilidad intermedia a tetraciclina. Se sospechó la presencia de un enzima de tipo AmpC por sinergia de doble disco empleando ácido fenilborónico (300ug). Se confirmó la presencia de *bla*_{CMY-2} por amplificación por PCR y posterior secuenciación. El entorno genético de *bla*_{CMY-2} fue dilucidado por mapeo por PCR, observándose corriente arriba la presencia de *ISEcp1* y corriente abajo *blc* y *sugE*, correspondiendo al entorno previamente descrito para este gen. El plásmido portador de *bla*_{CMY-2} no pudo ser transferido por conjugación. Dicho plásmido correspondió al grupo de incompatibilidad IncN (Carattoli et al 2005) y su tamaño molecular fue estimado en 97kb a partir de la digestión con S1 nucleasa. Se realizó la determinación del secuenciotipo (ST) según <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>. Los alelos detectados fueron: *aroC*: 2, *dnaN*: 7, *hemD*: 9, *hisD*: 9, *pure*: 5, *sucA*: 9, *thrA*: 12, los cuales correspondieron con el ST 15. Por amplificación por PCR se investigó la presencia de los genes *avrA*, *sopE* y *gogB* que codifican para proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo III, de *shdA* perteneciente a la isla genómica de *Salmonella* Typhimurium, y *sb41* identificado como un gen viral. De los genes de virulencia analizados solo se detectó el gen *sopE*.

Conclusión: Si bien previamente se habían reportado cepas de *Salmonella* Heidelberg productoras de CMY-2 en Estados Unidos, Canadá, Rumania y España, hasta el momento no existen reportes previos en nuestro país de CMY-2 en *Salmonella* sp, así como tampoco descripciones de *Salmonella* Heidelberg productora de esta β-lactamasa en Sudamérica.

***Staphylococcus aureus* meticilino resistente de la comunidad: Prevalencia de un nuevo clon con alto potencial patogénico**

S Fernandez¹, Grupo de Trabajo de SAMR-AC de la Sociedad Argentina de Infectología*, S Lattar⁹, M Noto Llana⁹, D Sordelli⁹, M Mollerach¹

¹ Cát. de Microbiología, Fa. de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina. ² Sanatorio J. Mendez, CABA, Argentina. ³ Htal. F.J. Muñiz, CABA, Argentina. ⁴ CEMIC, CABA, Argentina. ⁵ Htal. Vte. López y Planes, Gral. Rodríguez, Buenos Aires, Argentina. ⁶ Htal. Nuestra Sra de Luján, Buenos Aires, Argentina. ⁷ Htal. Aeronáutico, CABA, Argentina. ⁸ Htal. UAI, CABA, Argentina. ⁹ Inst. de Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM -UBA-CONICET), Argentina

Introducción: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad (SAMR-AC) es un agente causal de infecciones en piel y estructuras relacionadas (IPER), aunque también produce infecciones invasivas. En Argentina se había descrito la prevalencia del clon ST5, *spa* t311, SCCmecIV, LPV+ hasta el año 2008. El objetivo de este trabajo fue estudiar las características los clones prevalentes y su potencial patogénico

Materiales y métodos: En el marco de un estudio prospectivo y multicéntrico (19 hospitales de Buenos Aires y Santa Fe) se recuperaron 174 aislamientos de pacientes mayores de 14 años con infección por SAMR-AC (según CDC) entre los años 2010 y 2011, siendo 146 aislamientos provenientes de IPER y 28 de infecciones invasivas,

Se analizó por PCR el tipo de SCCmec. La genotipificación fue realizada mediante “spatyping” y electroforesis de campo pulsado y secuenciación de múltiples loci (MLST)

La capacidad patogénica de los principales clones se ensayó en un modelo de osteomielitis aguda con ratas Wistar adultas. Se inocularon las tibias izquierdas con 10⁶ unidades formadoras de colonias (UFC) y luego de 96 h se evaluó el número de UFC/tibia. Como marcador de daño tisular se midió el índice osteomielítico (IO) de cada tibia infectada.

Resultados: El clon ST30-IV-t019 se encontró en 94/146 aislamientos de IPER (64,4%) y 23/28 aislamientos invasivos (82%). El clon ST5-IV-t311 representó el 25,3 % de las muestras analizadas (37/146). La presencia del clon ST30 se asoció significativamente con ocurrencia de infección invasiva (p=0,029, Fisher).

En el modelo de osteomielitis se recuperó un mayor número de UFC al infectar con el clon ST30-IV-t019 versus clon ST5-IV-t311 (p=0,0253, Mann Whitney) y los IO fueron también significativamente mayores para el clon ST30-IV-t019 (p=0,0139, Mann Whitney).

Conclusiones: Se documenta la prevalencia del clon ST30-SCCmecIV-t019, en reemplazo del clon ST5-IV-t311 como principal responsable de infecciones por SAMR-AC en la región central de Argentina. El nuevo clon prevalente mostró mayor capacidad de establecerse en el nicho óseo y causar daño en ese tejido.

Actividad In Vitro De Colistina Frente A *Stenotrophomonas Maltophilia*

Rodríguez CH, M. Nastro; B. Weyland; S. Garcia; C. Barberis; C. Vay; A. Famiglietti

Lab. de Bacteriología Clínica, Dpto. de Bioquímica Clínica, Htal. de Clínicas José de San Martín, Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires, Argentina. INFIBIOC, UBA

Stenotrophomonas maltophilia es un bacilo gram negativo no fermentador. Se lo aísla principalmente en materiales respiratorios de pacientes hospitalizados con múltiples tratamientos antibióticos y cierto nivel de inmunosupresión. Una característica importante de esta bacteria es su multiresistencia que abarca a casi todos los β-lactámicos, incluidos los carbapenemes. Existen pocas opciones antibióticas para su tratamiento, siendo trimetoprima-sulfametoxazol (TMS) y levofloxacina (LEV) las drogas más utilizadas. Frente al hallazgo de aislamientos resistentes a ambos antimicrobianos se debe recurrir a otras alternativas entre las cuales se encontraría colistina (COL).

Objetivo: Evaluar la actividad de colistina frente a aislamientos de *S. maltophilia* y su relación con el consumo de este antimicrobiano en el hospital.

Materiales y Métodos: Se estudio la actividad de COL frente a 525 aislamientos de *S. maltophilia* recuperados de materiales clínicos de pacientes atendidos en el Hospital de Clínicas José de San Martín entre los años 1996 y 2012.

La sensibilidad se determino mediante el método semicuantitativo de Marcenac y col. ensayándose las siguientes concentraciones de COL: 4 y 8 µg/ml. Los aislamientos fueron identificados mediante metodología convencional. Debido a que CLSI no ha establecido criterios de interpretación para colistina en *S. maltophilia*, se utilizó el punto de corte de *Acinetobacter* spp.

El uso de COL se registró a través del consumo de viales de 100 mg de colistina por año.

Resultados: En el período estudiado *S. maltophilia* represento el 2,1 % de los aislamientos de origen nosocomial y el 55 % se recuperó de muestras del tracto respiratorio inferior. Los niveles de resistencia a TMS y levofloxacina fueron de 20 y 22 % respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de la resistencia a COL se incrementó desde un 8 % en 1996 a 60,4 % en el año 2012. Durante esos años el consumo de COL aumentó 69 %.

Conclusión: De acuerdo a estos resultados COL no puede ser considerada una opción terapéutica en *S. maltophilia* resistentes TMS y/o LEV. La influencia del consumo de este antimicrobiano en la actividad de sobre *S. maltophilia* no ha sido previamente comunicada.

Contribución del intercambio de *carO* mediado por transferencia horizontal de genes y la sobre-expresión de *bla_{OXA-58}* inducida por ISAb825 en la evolución de la resistencia a carbapenemes en *Acinetobacter baumannii*.

Limansky A., Morán-Barrio J., Brambilla L., Piazza A., Cameranesi M., Viale A.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR- CONICET), FCByF, UNR. Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina. viale@ibr-conicet.gov.ar

La pérdida del canal de membrana externa CarO en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenemes como resultado de la inactivación insercional del gen codificante *carO*, ha sido reportada recientemente en nuestro laboratorio. En este contexto, caracterizamos dos nuevas secuencias de inserción (IS), ISAb825 e ISAb125. Identificamos asimismo entre las cepas estudiadas la presencia de ISAb825 corriente arriba del gen *bla_{OXA-58}* (denominado ISAb825-*bla_{OXA-58}*), generando un promotor híbrido que estimula significativamente la expresión de *bla_{OXA-58}* promoviendo un incremento de los valores de CIM a carbapenemes. Estas observaciones promovieron la evaluación de los eventos genéticos involucrados en la generación de resistencia a carbapenemes en cepas locales epidemiológicamente relacionadas de *A. baumannii*. Incluimos para ello un grupo de cepas multiresistentes (MR), que mostraron sensibilidad (Ab244) o resistencia a carbapenemes (Ab242 y Ab825). La presencia de *bla_{OXA-58}*, ISAb825, el determinante de resistencia ISAb825-*bla_{OXA-58}*, y la variante alélica *carO* fueron evaluadas por PCR y secuenciación; y los perfiles de proteínas de membrana externa mediante SDS-PAGE.

Las cepas Ab244, Ab242, y Ab825 exhibieron una elevada relación clonal, según el análisis efectuado empleando diversos métodos genotípicos. En la cepa MR sensible a carbapenemes Ab244 (CIM imipenem: 1 µg/ml), que contiene el alelo *carO* II, no pudo ser identificada la ISAb825 como tampoco *bla_{OXA-58}*. Por su parte, las cepas MR resistentes a carbapenemes Ab242 y Ab825 (CIM imipenem: 12 µg/ml y 16 µg/ml, respectivamente) mostraron la presencia del determinante de resistencia ISAb825-*bla_{OXA-58}* con localización plasmídica. Ambas cepas mostraron ser portadoras del alelo *carO* III, sin embargo en Ab825 el gen correspondiente a *carO* se halla interrumpido por la ISAb825 resultando en la pérdida de CarO en la membrana externa de la misma. Los resultados sugieren que Ab242 podría resultar de eventos de recombinación derivados de transferencia horizontal de genes a partir de una cepa relacionada clonalmente con Ab244. Los eventos genéticos seleccionados por presión ambiental incluirían tanto el intercambio alélico de *carO* como la adquisición de un plásmido portador del arreglo de resistencia ISAb825-*bla_{OXA-58}*. La selección posterior de cepas con mayores CIM a imipenem (i.e. Ab825), que exhiben adicionalmente el alelo *carO* III interrumpido por la ISAb825 sugiere que la pérdida total de CarO incrementa aún más la resistencia a carbapenemes. Estos resultados soportan el rol relevante de miembros de la familia CarO en la resistencia a carbapenemes en *A. baumannii*.

Caracterización funcional de la proteína de membrana externa CarO como canal para el transporte de imipenem en *Acinetobacter baylyi*.

Morán-Barrio J., Limansky A., Relling V., Brambilla L., Viale A.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR- CONICET), FCByF, UNR. Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina. viale@ibr-conicet.gov.ar

La proteína de membrana externa (PME) CarO pertenece a una nueva familia de PME presente solo en miembros de la familia *Moraxellaceae* de la clase Gammaproteobacteria. En el patógeno hospitalario *Acinetobacter baumannii* estas proteínas funcionan como canales de membrana externa (ME) para compuestos β -lactámicos carbapenemes y aminoácidos básicos, con una marcada preferencia por la ornitina entre éstos últimos. En este trabajo caracterizamos en células enteras el rol del homólogo de CarO en *A. baylyi* como canal para imipenem (IPM) y aminoácidos básicos. Construimos mutantes por delección del gen *carO* ($\Delta carO$) en la cepa *A. baylyi* ADP1 y transformamos con el plásmido pVIM (codificante de *bla_{VIM-11}*) que dirige la producción de lacarbapenemasa VIM-11. Las propiedades de canal de CarO para IPM fueron evaluadas mediante el análisis cinético de la degradación del IPM en células enteras en la mutante así como en la cepa salvaje *A. baylyi* ADP1, en presencia y ausencia de diferentes compuestos competidores incluyendo diferentes aminoácidos y poliaminas.

La cinética de ingreso de IPM en *A. baylyi* indicó la presencia de un sitio específico saturable en la ME a través del cual ocurre el ingreso a bajas concentraciones de IPM. Aminoácidos básicos como la arginina, ornitina, lisina e histidina fueron inhibidores efectivos del ingreso de IPM a células de *A. baylyi*, mientras que otros aminoácidos y poliaminas no fueron capaces de inhibir el ingreso de IPM.

Estos resultados sugieren que los miembros de la familia CarO de *Acinetobacter* funcionan fisiológicamente como canales específicos de la ME para aminoácidos básicos permitiendo así el ingreso de compuestos relacionados estructuralmente, como el IPM. Esta característica adquiere relevancia en el patógeno *A. baumannii*, frecuentemente expuesto a carbapenemes en ambientes hospitalarios.

Aspectos evolutivos y de diseminación que explican la arquitectura actual de los integrones de clase 2.

Ramírez, MS, Igarzabal A, Piekar M, Chua K, Whye N, Centrón D.

Instituto de Microbiología y Parasitología Médica, Universidad de Buenos Aires-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (IMPAM, UBA-CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Dentro de los integrones, los integrones de clase 1 y 2 son los más relevantes a nivel clínico ya que están directamente involucrados con el aumento de la multirresistencia antibiótica. En nuestro país hemos observado dos características peculiares vinculadas a los integrones de clase 2. Una de ellas, es la alta y sostenida prevalencia en *A. baumannii* y *E. cloacae* a lo largo de más de 20 años, llegando a más del 50% en algunos períodos en *A. baumannii*. En lo que respecta a la segunda característica, hemos observado la emergencia regional de alelos funcionales de este elemento genético en *E. coli*, lo cual evidencia una epidemiología local que merece ser investigada. La mayoría de estos integrones han sido reportados embebidos en el transposón Tn7, lo cual favorece su dispersión, puesto que les brinda la posibilidad de transponer con alta eficiencia a plásmidos conjugativos y bacteriófagos así como al cromosoma bacteriano. El objetivo general del presente estudio, fue investigar el rol que cumple Tn7 a nivel evolutivo y de dispersión de los integrones de clase 2. Para ello analizamos a nivel experimental y por bioinformática, la asociación del gen *intI2* al Tn7 en 6 cepas de nuestro laboratorio que previamente identificamos que no poseían ninguno de los 5 genes de transposición del Tn7. Se diseñaron cebadores para la región Tn7L, zona izquierda de las repeticiones invertidas del Tn7, que, en la reacción de PCR con el cebador *intI2F*, producía un amplicón de 1250 pb en *In2-7::Tn7*. Se analizaron cepas pertenecientes a *A. baumannii* y *E. coli* aisladas de muestras clínicas, así como muestras de *Proteus* spp. aisladas de hisopados rectales de ratones colilargos de campo y de *Pseudomonas fragi* aislada de sitios con bajo impacto antrópico. La reacción de amplificación resultó positiva en todas las cepas, inclusive en la cepa de *E. coli* que poseía un alelo funcional de *intI2*. Además se realizó un estudio de bioinformático donde se buscó la región Tn7L. Dicha región se encontró presente en al menos 37 secuencias depositadas en el Genbank las cuales poseían además *intI2*. Por otro lado, analizamos la frecuencia de inserción del mini-Tn7 en cepas de *A. baumannii*, y *E. coli*. Encontramos una frecuencia de inserción del 100% y 40%, respectivamente. Tomado en su conjunto, estos estudios sugieren que *intI2* fue embebido muy posiblemente antes de la era antibiótica en el transposón Tn7, sufriendo una mutación *stop* una vez inserto, diseminando con esta arquitectura a varios nichos; posteriormente, dicha variante alélica ya embebida en Tn7 habría sido seleccionada en el ambiente clínico. Además, la exitosa inserción del mini-Tn7 evidencia la afinidad de este elemento a varios genomas bacterianos.

Cassettes inusuales y sus sitios de recombinación.

María Paula Quiroga y Daniela Centrón.

Instituto de Microbiología y Parasitología Médica, Universidad de Buenos Aires-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (IMPAM, UBA-CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Los integrones son elementos genéticos claves en la captura, expresión y dispersión de genes que se encuentran en forma de *cassettes*. Codifican una recombinasa sitio específica, la integrasa (*IntI*), que reconoce el sitio *attI*, adyacente al gen *intI*, y los sitios *attC*. A su vez, los *cassettes* son los elementos móviles de esta plataforma genética, y están formados por un marco de lectura abierto (ORF) y un sitio *attC*. Los *cassettes* cobran vital importancia en salud pública, ya que codifican determinantes de resistencia a todas las familias de antibióticos utilizados en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias gram-negativas. A partir de análisis de bioinformática evidenciamos la presencia de tres grupos de *cassettes* inusuales a los que denominamos $\Delta attI$ -like, $\Delta attC$ -like y *yattC::Tn-like*, cuya movilidad fue cuestionada previamente por otros grupos pero que comprobamos en ensayos de recombinación *in vivo* en el presente estudio. El objetivo de este trabajo fue identificar la variedad de *cassettes* inusuales encontrados en diferentes clases de integrones y analizar sus sitios de recombinación atípicos, mediante estudios de bioinformática y experimentales. Para lograrlo, realizamos su búsqueda en la base de datos GenBank, en la literatura, e incluimos secuencias de nuestro laboratorio, con diferentes herramientas de bioinformática tales como los programas BLAST, mFold, RAC y XXR. El grupo $\Delta attI$ -like posee secuencias provenientes de delecciones de sitios *attI* tanto de integrones de clase 1 como de clase 2, en lugar de un sitio *attC* típico. El segundo grupo o $\Delta attC$ -like presenta secuencias no compatibles con las del sitio *attC* típico o con el $\Delta attI$ -like, y su origen es más incierto. Encontramos distintos tipos de *cassettes* inusuales del tipo $\Delta attC$ -like en diferentes clases de integrones, en la zona variable de los integrones de clase 1, 2, e incluso en integrones cromosómicos asociados a diferentes nichos ecológicos. El tercer grupo posee al sitio *attC* invadido por elementos móviles, ya sea por intrones del grupo II de clase C-*attC*, o por transposones de la familia de la IS1111, lo cual resulta en sitios *attC* inusuales más largos que contienen una compleja estructura secundaria a nivel ADN. Además, al evaluar las estructuras secundarias de los sitios de recombinación atípicos de *cassettes* inusuales cuya funcionalidad estudiamos tomando al menos un representante por grupo en estudios de recombinación *in vivo*, encontramos patrones moleculares comunes entre los sitios de recombinación típicos y atípicos que determinan su funcionalidad. En base a estos resultados, pusimos en evidencia que los *cassettes* inusuales no son exclusivos de una clase particular de integrones y consideramos que el análisis molecular y funcional de estos *cassettes* puede aportar datos sobre la captación de *cassettes* inusuales, sobre cómo afectan a la dispersión de los *cassettes* y diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos así como sobre el origen de la formación de *cassettes*.

Integrasas De Clase 1 Funcionales *In Vivo* En Cepas Ambientales

Nardelli M, Quiroga MP, Centrón D

Los integrones son estructuras genéticas presentes en el 17% de los genomas bacterianos capaces de mediar la recombinación sitio-específica de *cassettes* móviles, dando lugar así a una región variable muy dinámica que puede captar y a la vez donar genes con funciones muy variadas. Están compuestos de una integrasa, su sitio de reconocimiento y un promotor para la expresión de los *cassettes* que integran. Se han reportado innumerables casos de integrones asociados a la multiresistencia antibiótica, confiriendo resistencia a casi todos los antibióticos de uso médico. Los integrones de clase 1 son los más frecuentes en aislamientos clínicos, pero poco se sabe respecto de su dispersión en el ámbito no clínico. De hecho, la funcionalidad de las integrasas de clase 1 ambientales no ha sido aún analizada. El objetivo de este trabajo es evaluar la funcionalidad de integrasas de clase 1 presentes en bacterias ambientales mediante ensayos *in vivo*. Se dispuso de 11 aislamientos de agua, suelo y feca de zorro provenientes de sitios con distinto grado de urbanización de Iguazú y de Tierra del Fuego. La funcionalidad de la integrasa se determinó por la capacidad de integración de los *cassettes* *aadB* y *bla_{VIM-2}* de resistencia a gentamicina y carbapenemes, respectivamente. Cada *cassette* fue incorporado en la bacteria ligado a un plásmido ColE1 comercial dentro de la estructura *attI1-aadB-attC* o *attI1- bla_{VIM-2}-attC*. De los 11 aislamientos, 5 resultaron ser competentes naturales (*Escherichia coli* 4IgSN1, *Pantoea dispersa* 10FZSS14, *Pseudomonas* sp. 1SL5, *Acinetobacter* sp. 1IgSLAM1 y *Acinetobacter* sp. 1IgSN3), por lo que la transformación sólo requirió agregar el plásmido a 5µl de cultivo bacteriano. Los 6 restantes (*Aeromonas media* 1AC2, *Vibrio* sp. 1AC4, *Aranicola* sp. 9AL34, *Pseudomonas* sp. 7AN1, *Enterobacter* sp. 10AL1 y *Enterobacter* sp. 1IgSLAM2) fueron hechos químicamente competentes con CaCl₂ y transformados por *shock* térmico. No pudieron seleccionarse los transformantes positivos a partir de la resistencia brindada por el vector, por lo que se procedió a sembrar en placa una dilución del cultivo 18hs post-transformación, para luego extraer el ADN total de la confluencia. La inserción del *cassette* en el sitio *attI1* nativo se evidenció por PCR con cebadores específicos y secuenciación en todos los aislamientos salvo en *Pseudomonas* sp. 7AN1. El *cassette* inserto fue mantenido en ausencia de presión de selección antibiótica al menos 30 días post-transformación en medio líquido subcultivando periódicamente en las cepas de *E. coli* y *Pseudomonas* sp. competentes naturales. Además, en estos aislamientos la presencia del *cassette* inserto, ya sea *aadB* y *bla_{VIM-2}* no demostraron tener un costo sobre el *fitness* de la bacteria en un experimento de competencia entre la cepa con y sin el *cassette*. Estos resultados plantean un escenario en el cual las bacterias provenientes tanto de la clínica como del ambiente intercambian material genético a través de un flujo bidireccional, siendo las bacterias ambientales reservorio de *cassettes* de resistencia antibiótica, y, al mismo tiempo, pueden brindar a las bacterias patógenas de humanos de nuevos *cassettes* con las funciones requeridas para la supervivencia en ambientes de *stress*, tal como es el nicho intrahospitalario.

SIMPOSIO

“FARMACOPEAS”

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
AULA DE FÍSICA – PLANTA BAJA**

17 DE OCTUBRE DE 2013

PROGRAMA	
14:00 hs	Palabras de bienvenida del Presidente de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, Académico Carlos M. Baratti
14.10 hs.	Presentación: Académico Héctor I. Giuliani, (Director Ejecutivo F. A.)
14.20 hs.	“El papel de las Farmacopeas como instrumento de la Salud Pública”. Farm. Melina Assalone y Celeste De Angelis.
15.00 hs.	Comentarios
15.10 hs.	“Elaboración de las sustancias químicas de Referencia” Académico Carlos Gaozza
15.50 hs	Café
16.10 hs.	“Desarrollo de sustancias químicas de Referencia en la ANMAT” Farm. Melina Dal Mas.
16.45 hs.	Comentarios y Discusión final
17.00 hs.	Entrega de los Premios Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica 2011.
18: 00 hs	Cierre.

SIMPOSIO FARMACOPEA

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA,

17 DE OCTUBRE DE 2013

Los avances en investigación científica y desarrollo tecnológico en sintonía con la abundante información y educación en temas concernientes a la salud, que se han puesto de manifiesto en la segunda parte del siglo XX y en lo que va del presente ha permitido lograr extraordinarios éxitos no solo en la prolongación de la vida sino también en un notable mejoramiento de su calidad.

La calidad de vida se sustenta en la producción de medicamentos cuya calidad, seguridad y eficacia son los objetivos a lograr a través de códigos de especificaciones técnicas que deben cumplir no solo la batería de medicamentos existentes sino también las innovaciones que están transformando los novedosos protocolos terapéuticos que velan por la salud a la cual consideramos como un bien social y no un bien de mercado.

La codificación de los principios activos, excipientes y productos farmacéuticos, las especificaciones que aseguran la calidad de los mismos y las tecnologías empleadas para su análisis están recopiladas en el libro oficial denominado FARMACOPEA que es el producto del trabajo integrado que llevan adelante profesionales de origen académico, científico e industrial de todo el país. Esta combinación hace que la FARMACOPEA, según nuestra opinión sea un compendio de características científicas, industriales y federales.

Miembros de la Academia y del Ente Coordinador de Unidades Académicas de Farmacia Y bioquímica - ECUAFYB y de las cámaras de Productos Farmacéuticos intervienen activamente en la generación de documentos, elaboración de monografías y elaboración y control de las sustancias de referencia que sustentan a las mismas.

Las normas y especificaciones resultantes son a su vez, elementos de consulta indispensable para la Autoridad Sanitaria, elaboradores, profesionales de la salud, investigadores y docentes, todos involucrados en la calidad farmacéutica que merece la salud de la población. Otras áreas sobre las inciden estas normas y especificaciones son la importación y exportación de fármacos y la armonización con otras farmacopeas.

En el mundo hay más de veinte farmacopeas activas, existiendo diferentes grupos que se dedican a la armonización y cuyo principal objetivo es el de establecer criterios de uniformidad que trasciendan las fronteras.

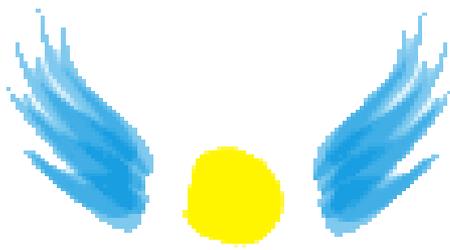
Las expositoras de hoy pertenecen a servicios normales del Instituto Nacional de Medicamentos y participan activamente en el quehacer de la Farmacopea Argentina de la cual conforman la Secretaría Técnica. Nos representan también en los foros de la Farmacopea Europea, de la USP y de la Internacional de la OMS, lo que asegura una significativa información de lo que pasa en el mundo. Completa el panel de disertantes el Académico Carlos Gaozza de quien todos conocemos su experiencia en la síntesis orgánica.

FARMACOPEA ARGENTINA

Farm. Melina I. Assalone

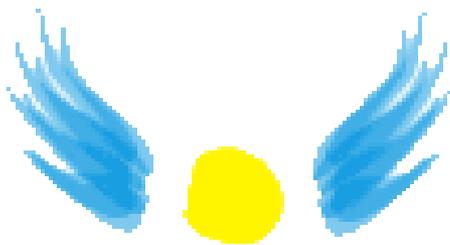
Farm. María Celeste De Angelis

Secretarias Técnicas



Farmacopea Argentina

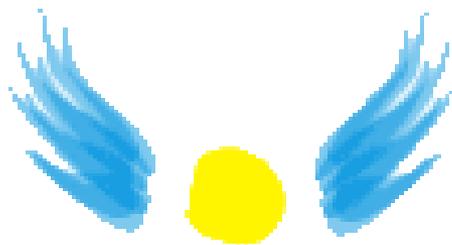
Es el libro oficial que codifica los principios activos, excipientes y productos farmacéuticos y contiene las especificaciones que estos deben cumplir para demostrar su calidad y resguardar la salud de la población.



Farmacopea Argentina

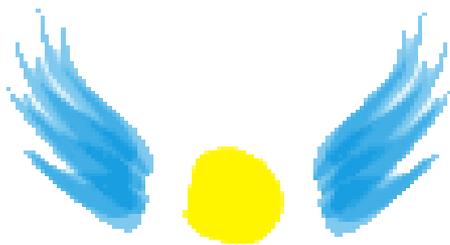
Objetivo:

Promover la Salud Pública estableciendo especificaciones que aseguran la calidad de los medicamentos, excipientes y tecnologías empleadas en el cuidado de la Salud.



Farmacopea Argentina

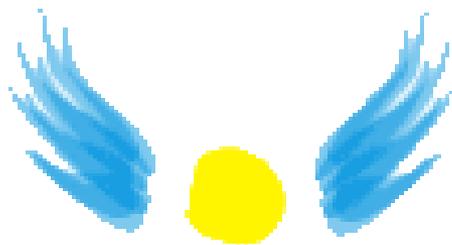
Las normas y especificaciones contenidas son elemento de consulta indispensable para la Autoridad Sanitaria, elaboradores, profesionales de la salud, investigadores y docentes, todos ellos involucrados en el aseguramiento de la calidad que deben poseer los medicamentos para su empleo seguro por parte del paciente.



Farmacopea Argentina

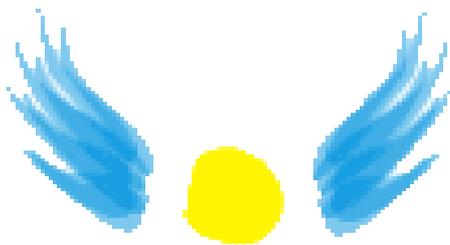
ARGENTINA Marco legal LEY N° 16.463/64

Art. 3° - Los productos comprendidos en la presente ley deberán reunir las condiciones establecidas en la Farmacopea Argentina y, en caso de no figurar en ella, las que surgen de los patrones internacionales y de los textos de reconocido valor científico.



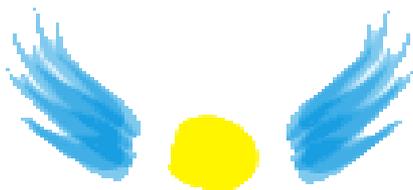
Farmacopea Argentina

RESEÑA HISTORICA



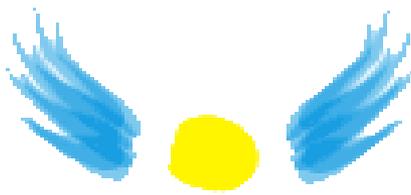
Farmacopea Argentina

- **Primera Edición** 1898 Ley 3041-93
- **Segunda Edición** 1921 Ley 10983-19
- **Tercera Edición** 1943 Ley 12729-41
- **Cuarta Edición** 1956 Dec. 25388-56
- **Quinta Edición** 1966 Ley 16969-66
- **Sexta Edición** 1978 Ley 21885-78
- **Séptima Edición** 2004 Dec. 202-03



Farmacopea Argentina

TEXTO DEL DECRETO 202/03



Art. 1º - Aprobación del texto del 1º Volumen de la Séptima Edición de la FA.

Art. 2º - Vigencia del mismo a partir de su publicación en el boletín oficial.

Art. 3º - Es de uso obligatorio en todas las farmacias, droguerías, empresas elaboradoras e importadoras de drogas y medicamentos, distribuidoras.

También de uso obligatorio para aquellos que elaboren o importen productos médicos.

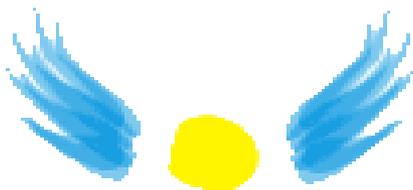


Art. 4º - Se encomienda al Ministerio de Salud la confección de los siguientes volúmenes.

Art. 5º - Queda prohibida la reimpresión sin autorización del Ministerio de Salud y sólo producirá efecto legal la edición oficial.

Art. 6º - Se comunica al Congreso de la Nación.

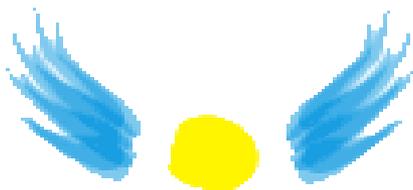
Art. 7º- Registro de la misma en la Dirección general del Registro Oficial.



Farmacopea Argentina

CONTENIDO DEL PRIMER VOLUMEN DE LA SÉPTIMA EDICIÓN

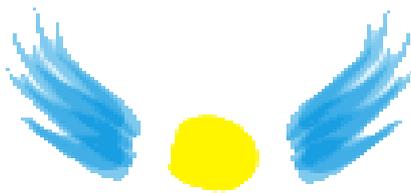
- **Consideraciones Generales**
- **Métodos Generales de Análisis**
- **Textos de Información General**
- **Reactivos, Soluciones y Tablas**



Farmacopea Argentina

SEGUNDO, TERCER Y CUARTO VOLUMEN

En proceso de aprobación por parte
de la Autoridad Sanitaria

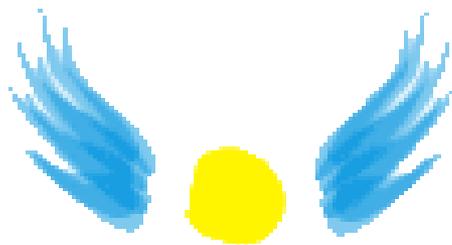


Contenido pendiente de Aprobación

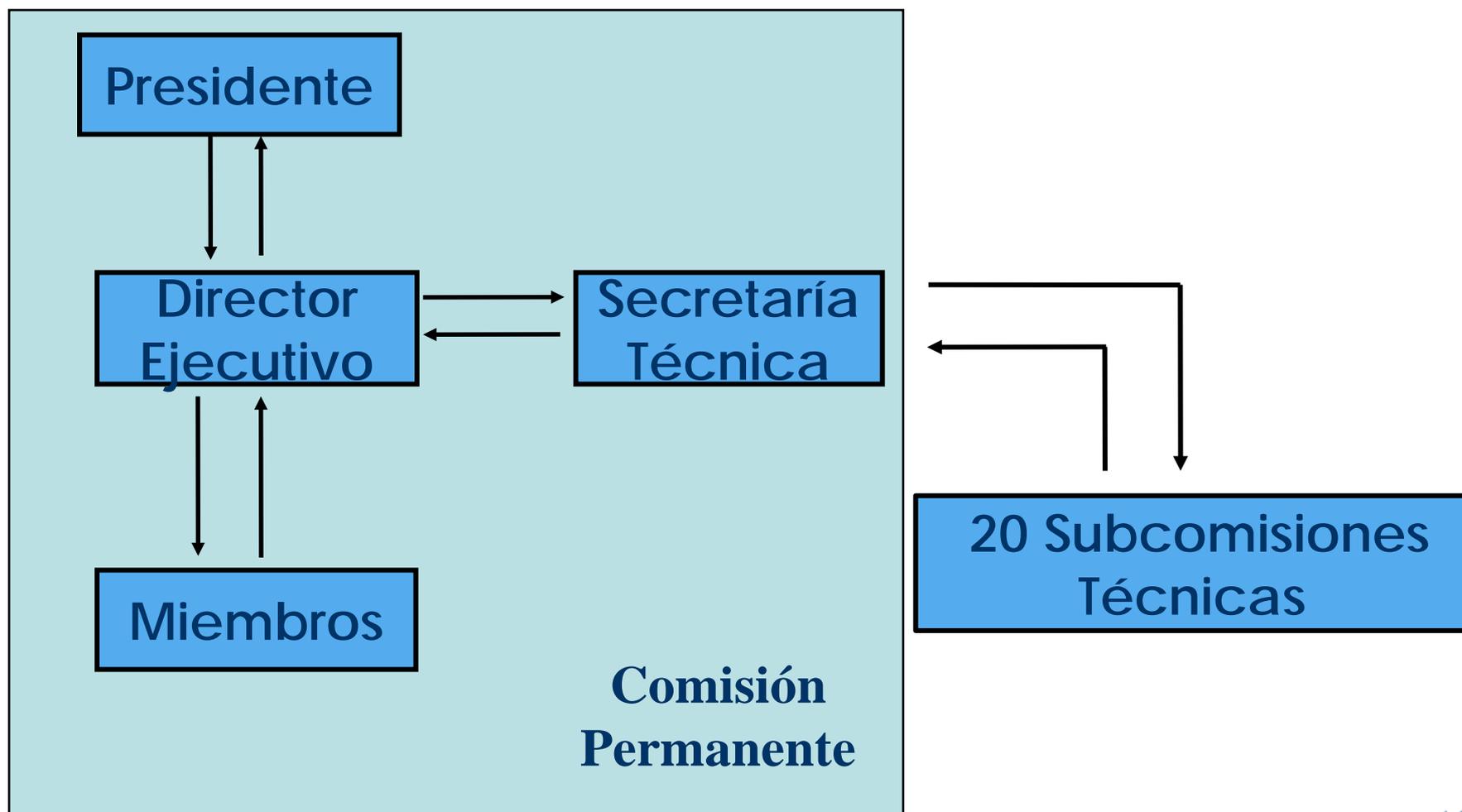
2° Volumen: Monografías de materias primas.

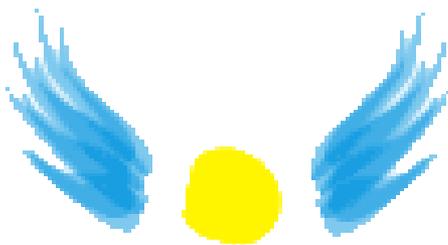
3° Volumen: Monografías de productos terminados. Apartados (Productos Médicos, Productos Biológicos, Productos Radiofarmacéuticos, Medicamentos Herbarios, Vacunas y Hemoderivados)

4° Volumen: Nuevas Consideraciones Generales; Nuevos Métodos Generales de Análisis; Nuevos Textos de Información General; Reactivos, Soluciones y Tablas



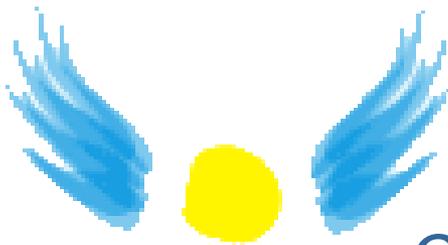
ESTRUCTURA



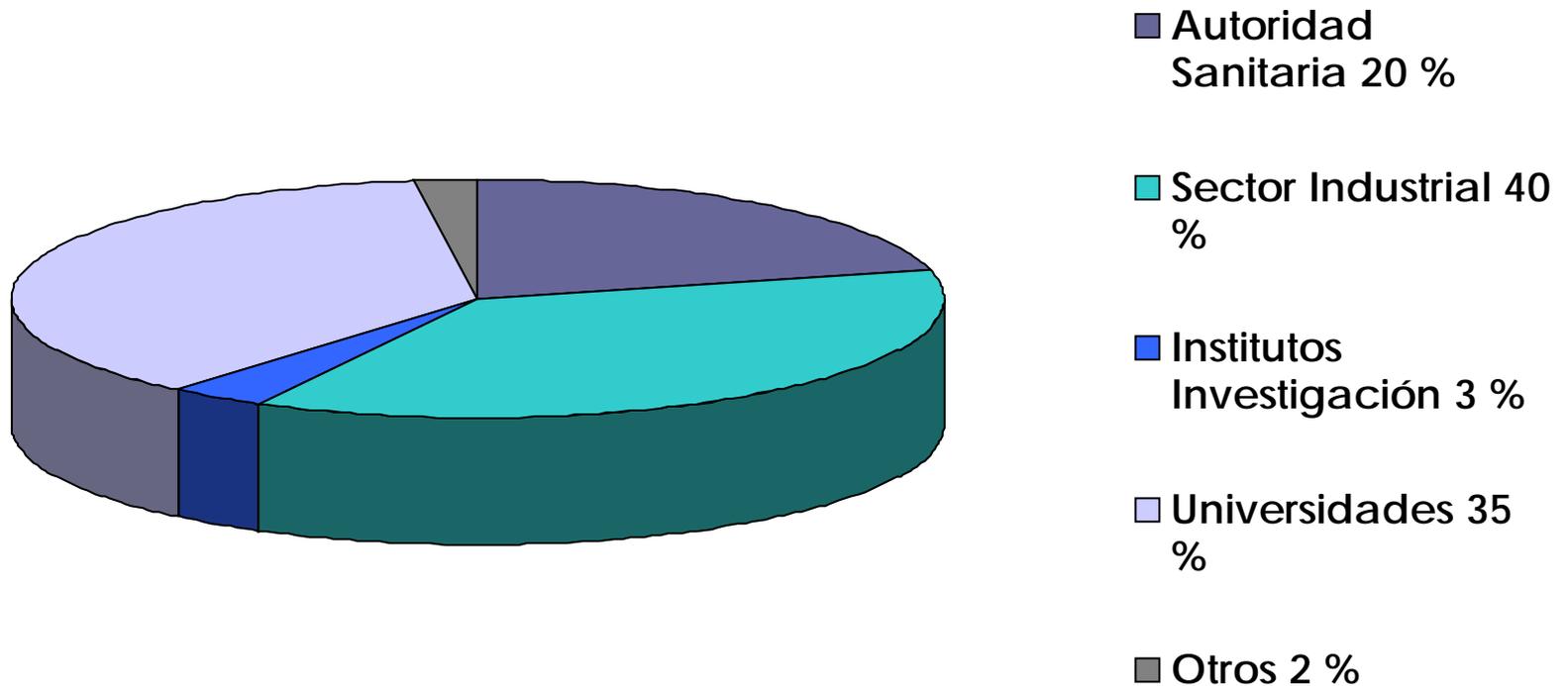


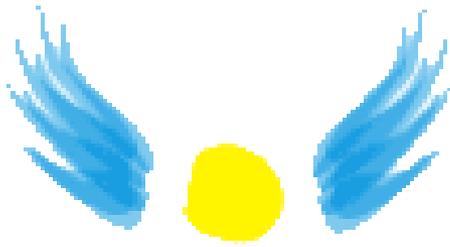
SUBCOMISIONES TÉCNICAS

- Agua y Soluciones Parenterales
- Estabilidad y Envases
- Drogas vegetales y Medicamentos Fitoterápicos
- Microbiología
- IFAs y Productos Terminados I, II, III Y IV
- Radiofármacos
- Biodisponibilidad, Bioequivalencia y Equivalencia Farmacéutica
- Controles toxicológicos
- Colorantes , Excipientes y Aditivos
- Productos Biotecnológicos
- Gases medicinales
- Productos Médicos
- Productos biológicos
- Sangre y Hemoderivados
- Sueros y vacunas
- *Farmacia Hospitalaria*
- *Farmacia Oficial*



Composición de las Subcomisiones Técnicas

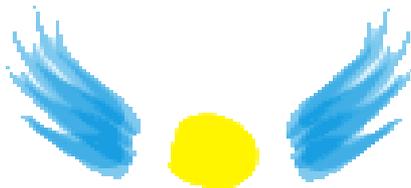




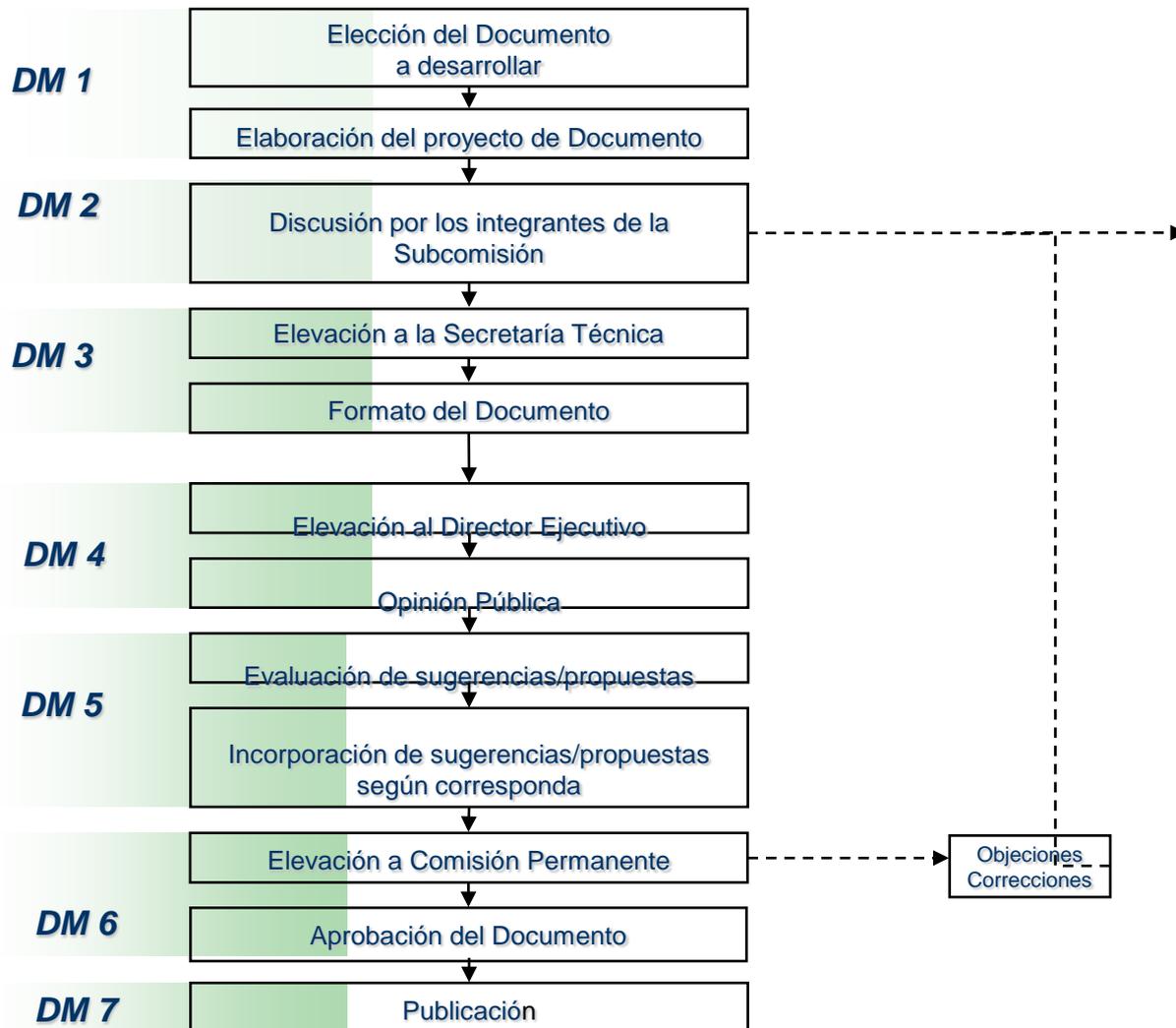
Farmacopea Argentina

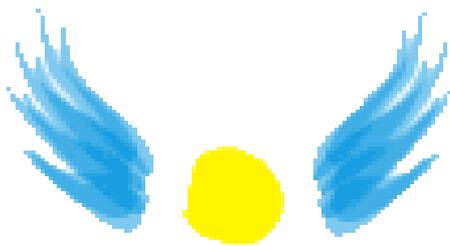
- Sector Académico
- Agencias regulatorias
- Sector Industrial

PARTICIPACIÓN CONTINUA Y DINÁMICA



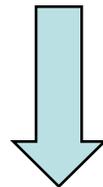
DESARROLLO DE DOCUMENTOS



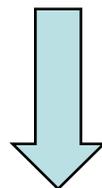


Farmacopea Argentina

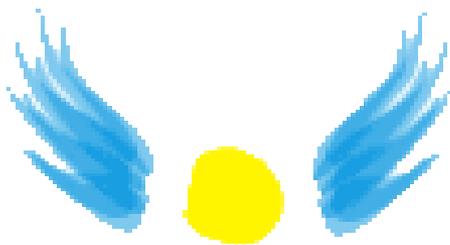
**Política de Medicamentos del País
o de la Región**



Define Política de Contenidos de Farmacopea

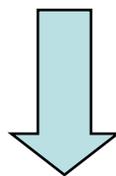


Define CALIDAD

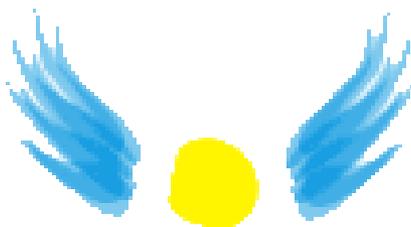


Farmacopea Argentina

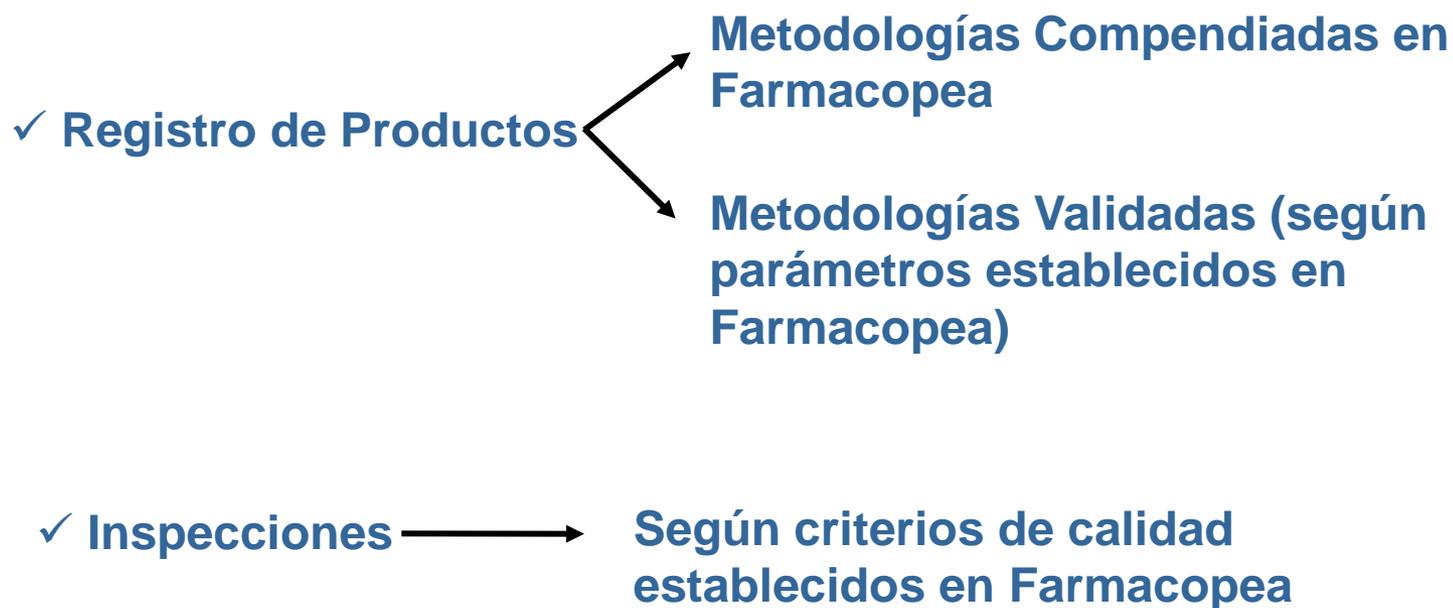
**Definido el contenido de la Farmacopea,
resulta necesario:**

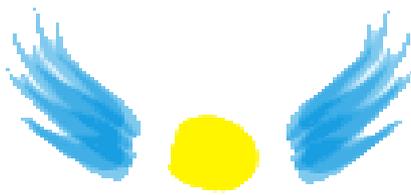


- Seleccionar los ensayos y metodologías de análisis que definirán la calidad de los IFAs y de los productos farmacéuticos.**
- Desarrollo de las Sustancias de Referencia.**



Aplicación de la Farmacopea por la Autoridad Sanitaria





Como obtener resultados confiables?

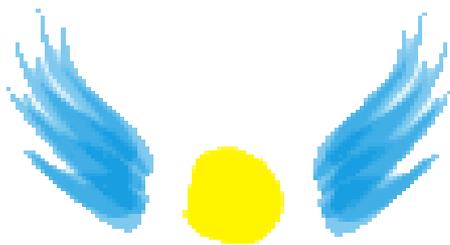
- Monografías Farmacopeicas

Todos los métodos farmacopeicos deben ser VERIFICADOS:

especificidad – recuperación (exactitud)

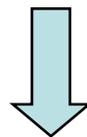
- Monografías No Farmacopeicas

Todos los métodos propuestos deben ser VALIDADOS siguiendo los lineamientos del capítulo farmacopeico (<1040> Validación de métodos analíticos)

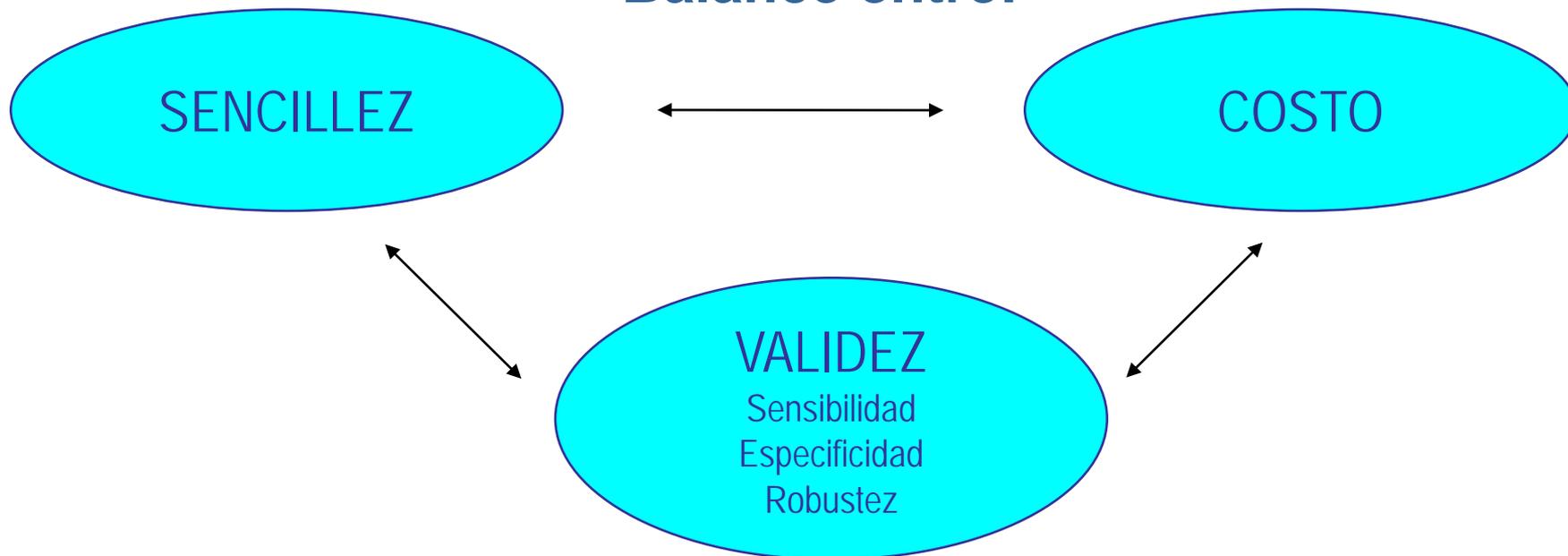


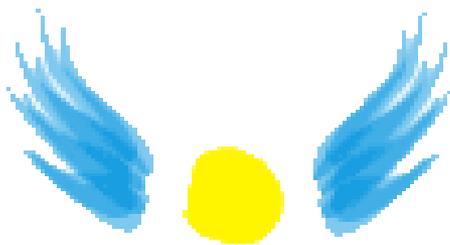
Farmacopea Argentina

Selección de la Metodología a emplear



Balance entre:

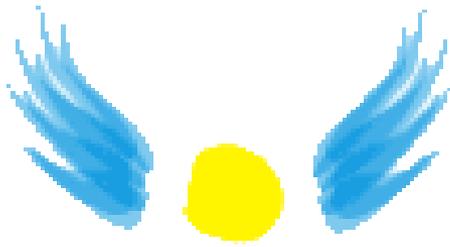




Farmacopea Argentina

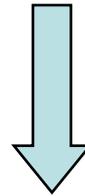
Sin embargo, resulta imperioso que la Farmacopea, además, establezca ensayos sencillos que permitan responder rápidamente frente a una situación de riesgo sanitario independientemente de la disponibilidad de tecnología.

Por ejemplo, determinación de la composición cualitativa de un medicamento magistral en un puesto sanitario; determinación de la composición semicuantitativa de formulaciones pediátricas no disponibles

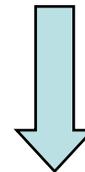


Farmacopea Argentina

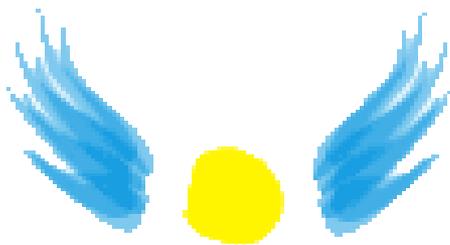
Metodología simple



Subsana urgencia

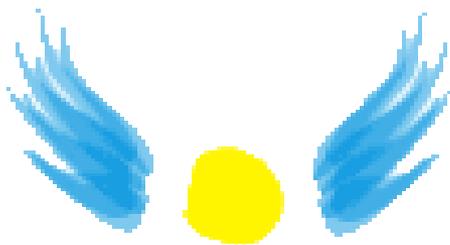


CONTENCIÓN



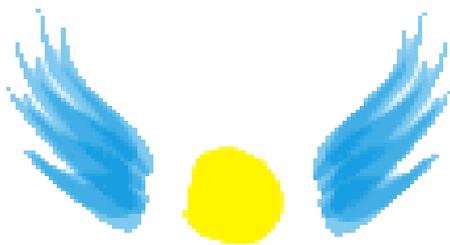
Farmacopea Argentina

Con todo lo expuesto anteriormente, observamos que la obtención de una Farmacopea con fin sanitario conlleva a un proceso muy arduo en el cual deben considerarse y equilibrarse diversos factores



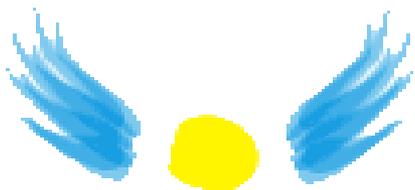
Farmacopea Argentina

Los documentos farmacopeicos deben estar diseñados para ser apropiados y adaptables a las necesidades de las Autoridades Regulatorias y a aquellos involucrados en el control de calidad y producción de IFAS y productos medicinales



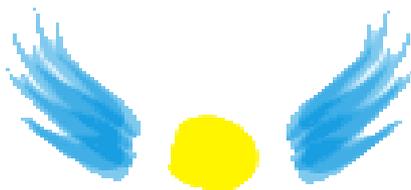
Farmacopea Argentina

- ✓ **Fortalecimiento de la Farmacopea aumentando el desarrollo local de metodologías y sustancias de referencia.**
- ✓ **Contribución a la independencia tecnológica con impacto directo en la salud de la población y en el desarrollo farmacéutico de la Industria Regional.**



Farmacopea Argentina

PROYECTO INTERNACIONAL



¿Por que la necesidad de una Integración Farmacopea?

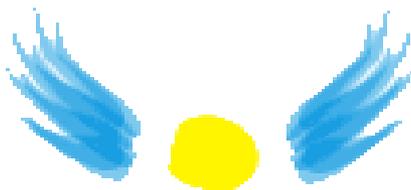
Fortalecimiento de las capacidades Institucionales de Regulación y Fiscalización.

Colaboración con la vigilancia, investigación, control de riesgos y daños: pilares en salud pública.

Desarrollo de recursos humanos y capacitación.

Reducción del impacto de las emergencias y desastres en la salud.

Aumento de la capacidad de prevención y promoción.

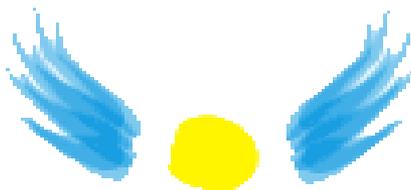


Farmacopea Argentina – Farmacopea Brasileña

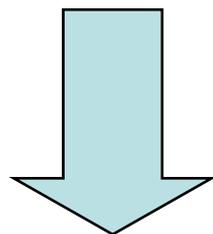
Acuerdo de Cooperación (Año 2008)

Punto 20 – Firmado por Presidentes de Argentina y Brasil

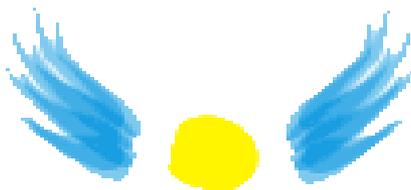
- Fortalecimiento de las Farmacopeas Argentina y Brasileña.
- Desarrollo en conjunto de Sustancias de Referencia (investigación, certificación, producción, comercialización y monitoreo).
- Desarrollo, intercambio y aporte tecnológico.

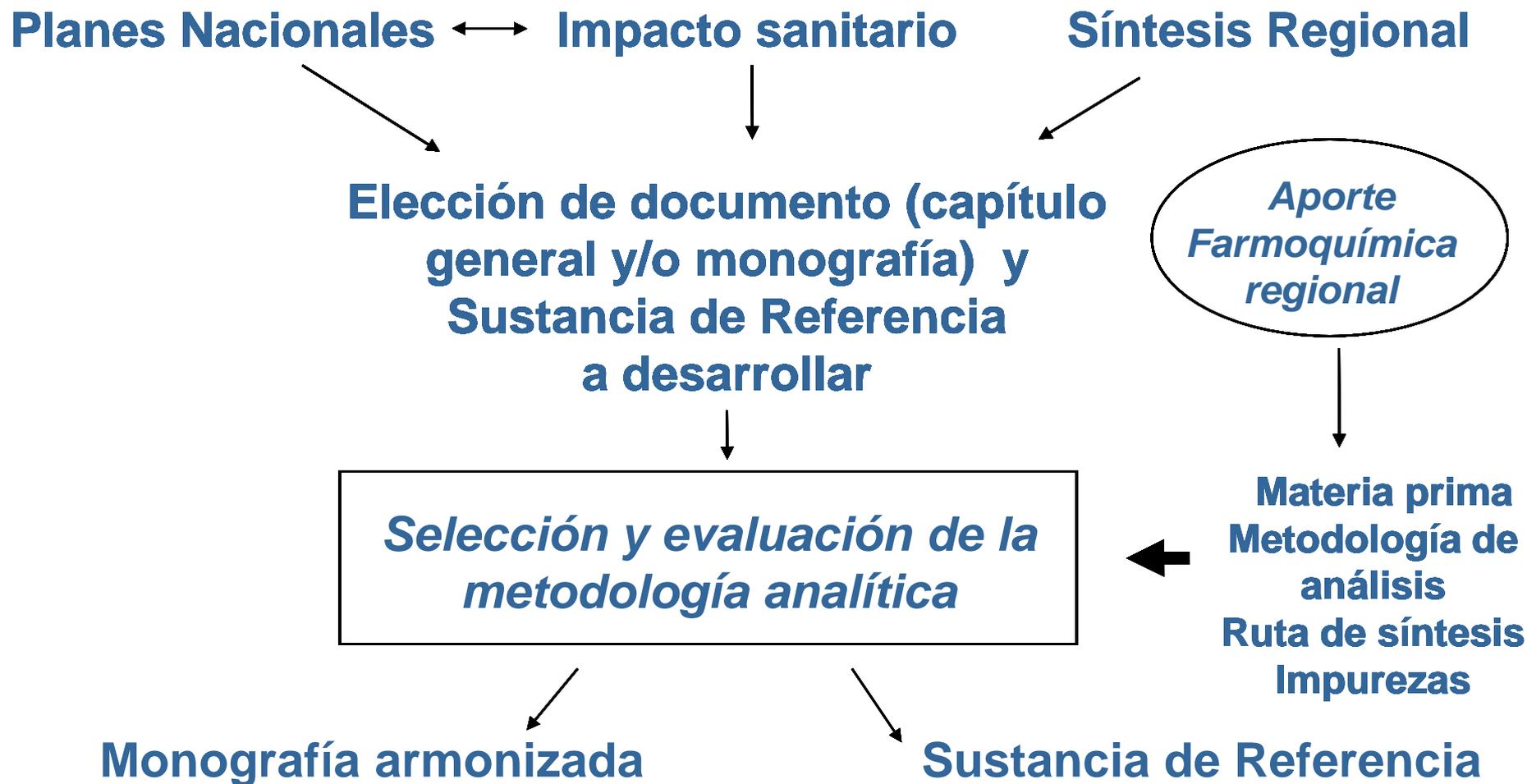
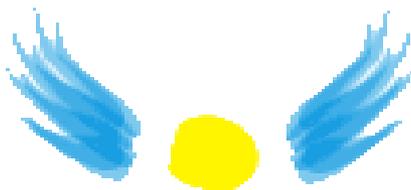


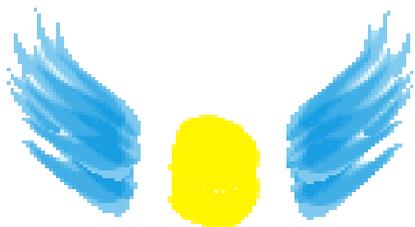
Puesto en marcha este proyecto, ambas delegaciones acuerdan extender la participación a los demás Estados Partes del MERCOSUR



Propuesta de creación de una Farmacopea Regional en el SGT 11 del Grupo Mercosur



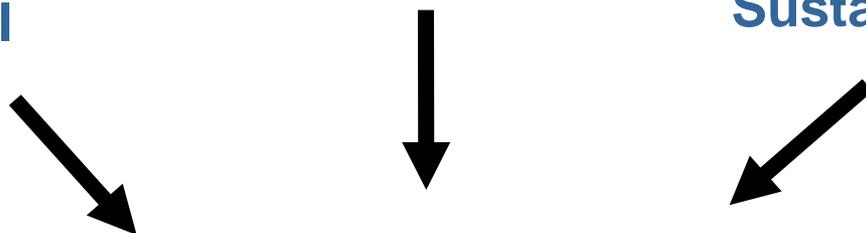




Monografía armonizada

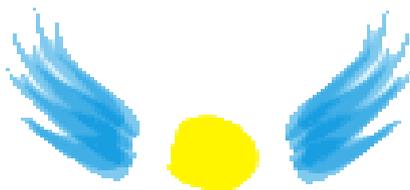
Capítulo general

Sustancia de Referencia



FARMACOPEA
MERCOSUR

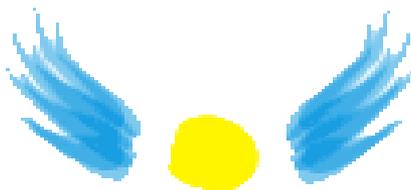
Atributos Específicos - Necesidad Regional



Resultados

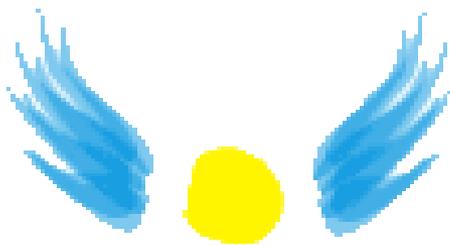
Obtención de un Código de especificaciones que sea aplicable y de consulta para los profesionales de la salud mediante la inclusión de los ingredientes farmacéuticos activos y los productos farmacéuticos comprendidos en los planes de salud y en los formularios terapéuticos nacionales.

Desarrollo, armonización y consenso de documentos farmacopeicos para la construcción de una Farmacopea Regional.

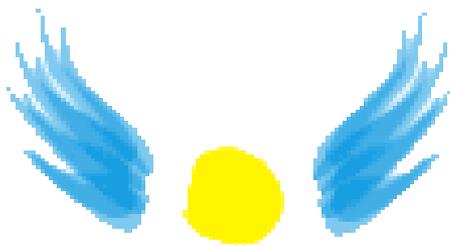


Farmacopea Argentina

NUEVOS DESAFÍOS



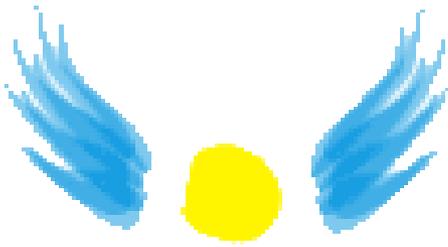
¿COMO LOS ATRIBUTOS FARMACOPÉICOS PUEDEN FORTALECER UNA POLÍTICA DE MEDICAMENTOS MULTIFUENTE?



Atributos Farmacopeicos y sus especificaciones



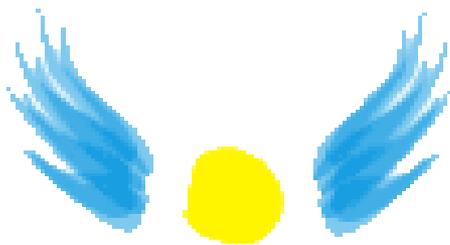
CALIDAD, SEGURIDAD y EFICACIA
de Especialidades Medicinales



Especialidades Medicinales Multifuente
cumplen con las especificaciones

pero

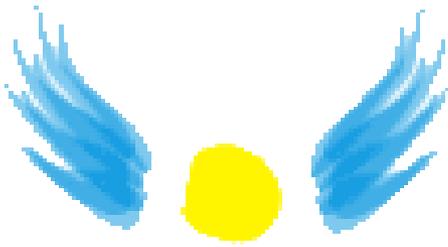
Diferencias en Efecto Terapéutico



Definir PUNTOS CRÍTICOS



Desarrollar NUEVOS ENSAYOS
que permitan evidenciar estas DIFERENCIAS
TERAPEÚTICAS
durante el Control de Calidad en el
Laboratorio

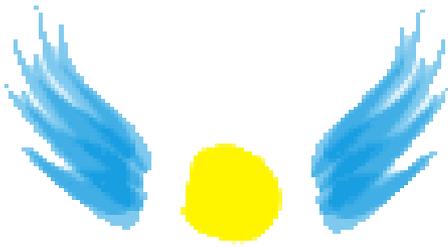


Nuevos ensayos farmacotécnicos: Inclusion?

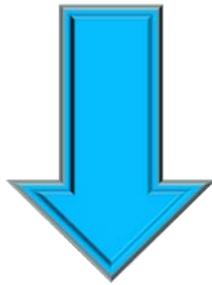
- ✓ Anfotericina Liposomal
- ✓ Propofol Liposomal

Farmacotoxicología: Nuevos ensayos farmacotécnicos / Físicoquímicos?

- ✓ Midazolam Solución Inyectable
- ✓ Anfotericina Liposomal



GRUPOS DE TRABAJO INTERDISCIPLINARIO



DISEÑO y DESARROLLO de
estos NUEVOS ENSAYOS

¡Muchas Gracias!

Av. de Mayo 869
(C1084AAD), Buenos Aires - Argentina
(+54-11) 4340-0800 / 5252-8200

ELABORACIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS DE REFERENCIA

Acad. Prof. Dr. Carlos H. Gaozza

17 de octubre de 2013

Criterios de Pureza

- PRIMITIVO (ARREFERENCIADO)
- REFERENCIADO A UN “ESTANDAR”

Procedimientos primitivos (arreferenciados)

- 1-Recristalizaciones sucesivas con diferentes solventes no modifican el punto de fusión.
- 2- Titulaciones volumétricas basadas en el peso fórmula de la sustancia.
- 3- Determinaciones fotocolorimétricas y espectrofotométricas.
- UN PRIMER AVANCE:
INTRODUCCIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA “PLANA”.

Origen de las impurezas, relación con procedimiento de síntesis

- - Por condensación de dos sintones (muy diferentes)



- - Secuencial



Procedimientos para la elaboración de sustancias de referencia

1 – Recristalizaciones sucesivas de un API Comercial o de sus sales

Exitoso

No Exitoso

Paradójico

2 - Cromatografía de un API comercial

Clásico en columna

HPLC macropreparativa

3- Síntesis en escala de laboratorio

4- Extracciones selectivas

Adsorbentes alternativos

- A- Ácido silícico
- B- Anhídrido silícico ⁽¹⁾
- C- Celulosa (fibras en polvo)
- D- Celulosa microcristalina
- E- Talco
- F- Almidón
- G- Bentonita
- H- Carbonato de calcio
- I- Carbonato de magnesio
- J- Carbón activado

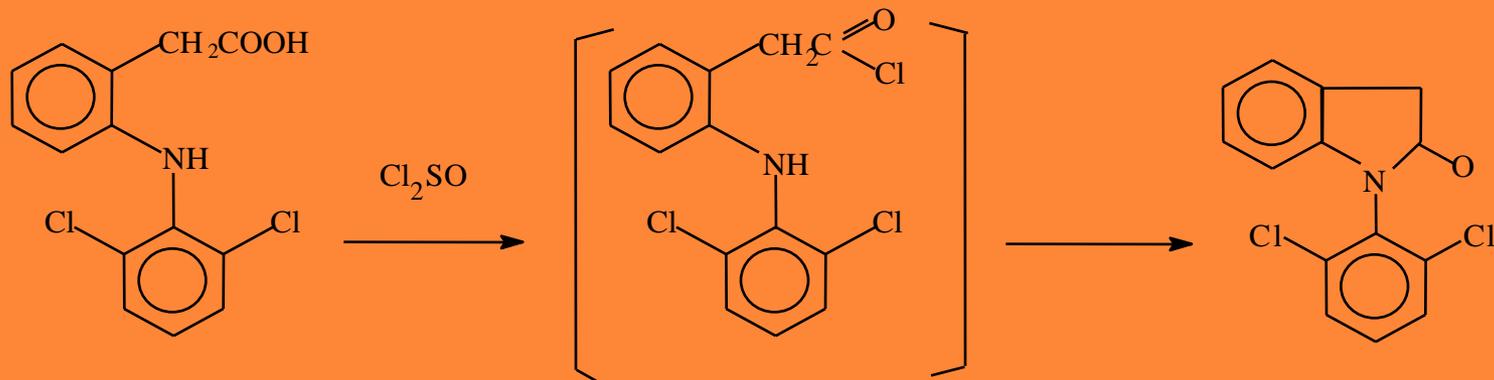
(1) Celite

Preparación de un Diclofenac sódico SR

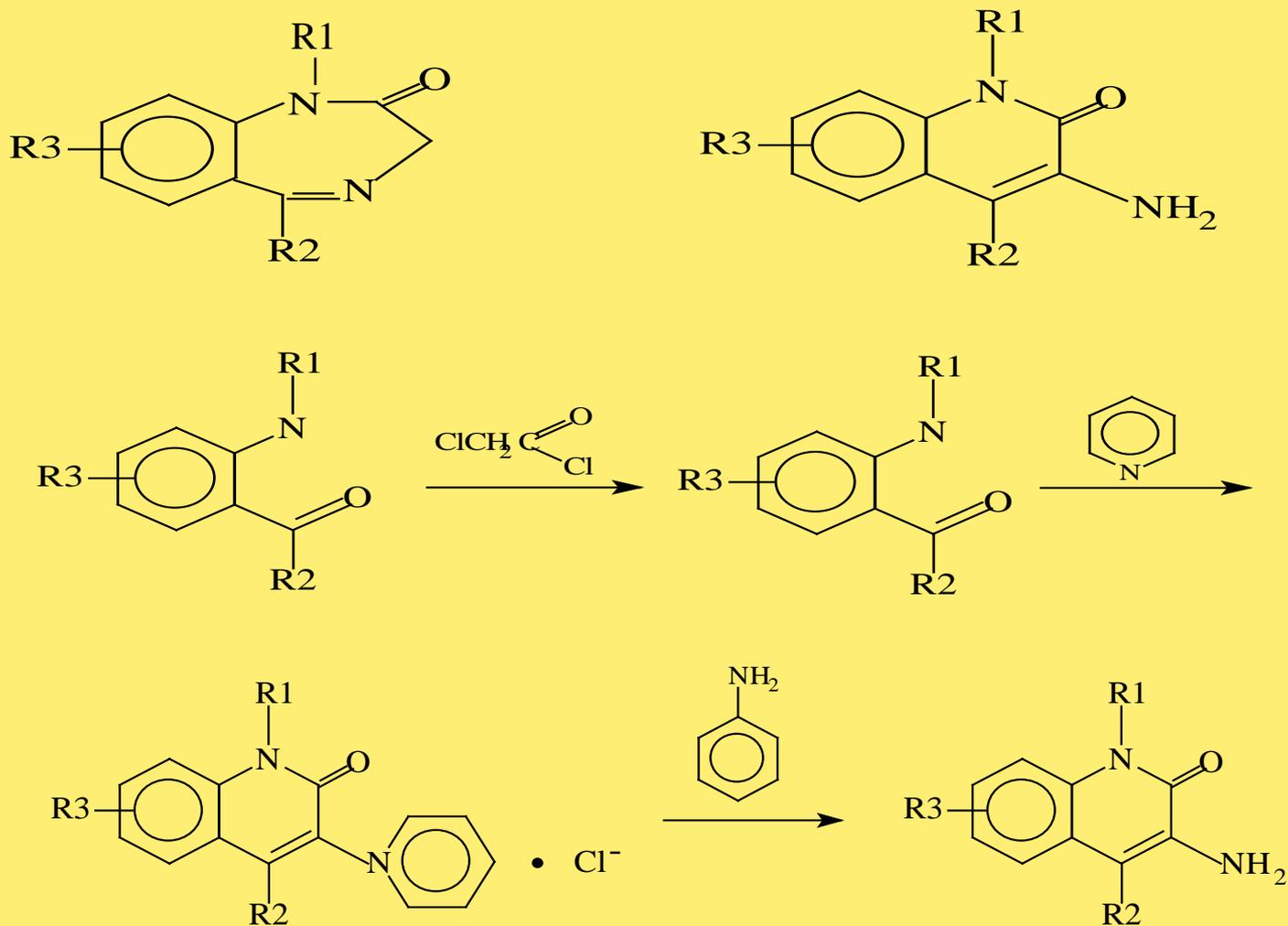
Diclofenac Na $\xrightarrow{\text{H}^+}$ Diclofenac H $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ se recristaliza

$\xrightarrow{\text{Na}_2\text{CO}_3}$ Diclofenac Na $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ se recristaliza

Síntesis de una impureza del Diclofenac



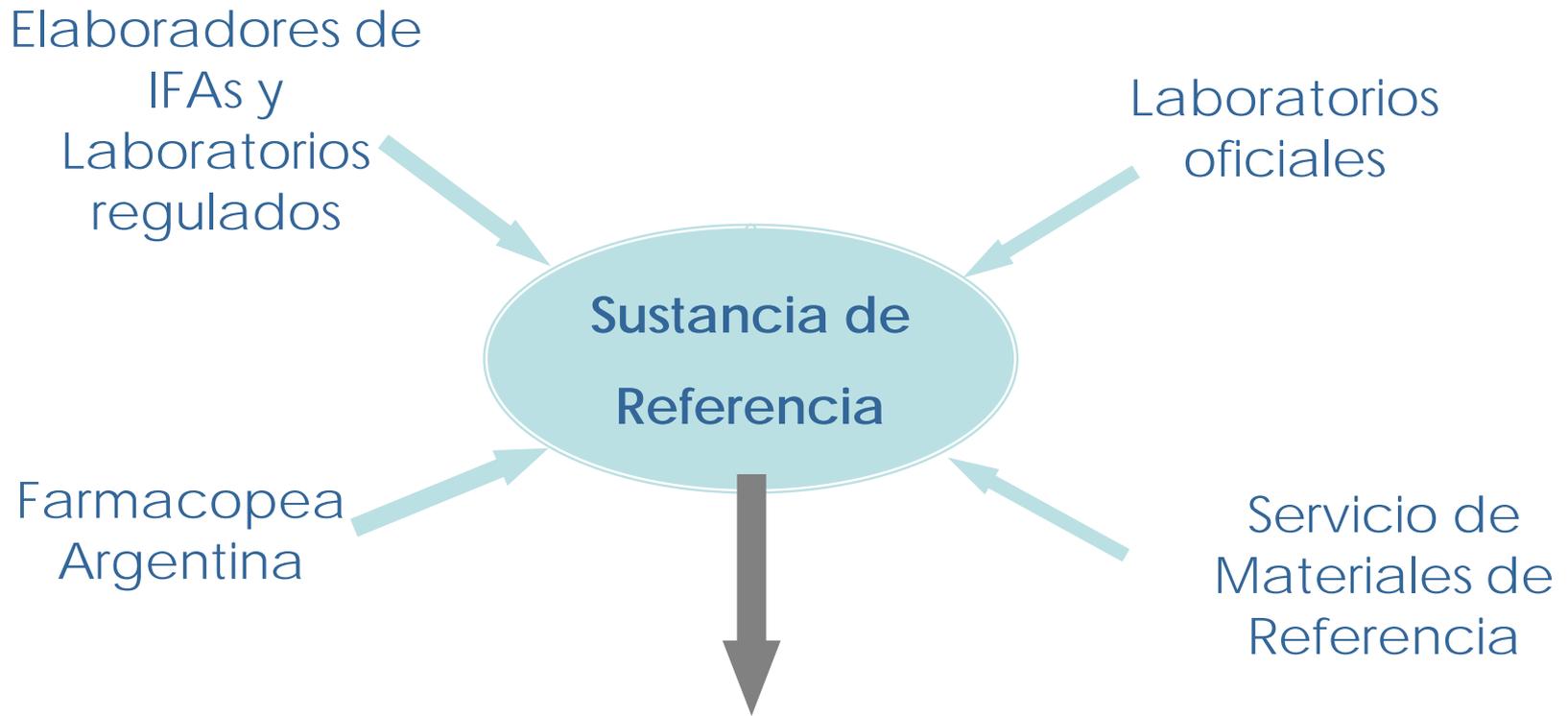
Una de las impurezas de las benzodiazepinas



Sustancias de Referencia

Farm. Melina Dal Mas

Introducción



Necesarias para la implementación de métodos analíticos

Contribuyen a resguardar la calidad de los productos farmacéuticos

Según el Comité de Expertos de la OMS en especificaciones para Preparaciones Farmacéuticas.
(WHO Technical Report Series, N° 943, Anexo 3)

DEFINICIONES

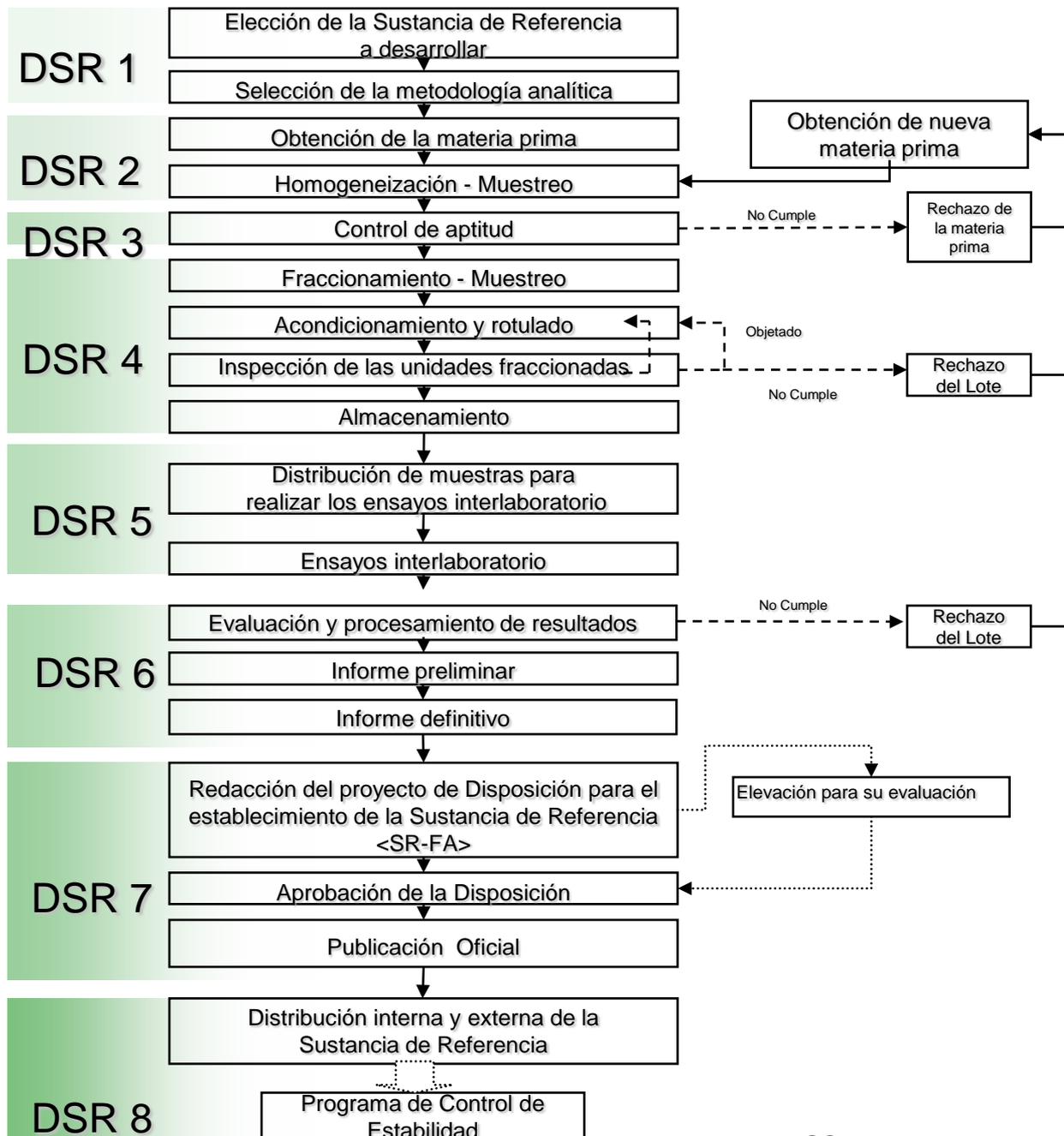
SUSTANCIA DE REFERENCIA

Material de uniformidad comprobada, cuyo empleo se reserva a ensayos químicos y físicos específicos, en los que se comparan sus propiedades con las de un producto problema y posee un grado de pureza adecuado al uso que se destina.

SUSTANCIA DE REFERENCIA FARMACOPEA ARGENTINA:

Material de uniformidad comprobada, cuya monografía ha sido incluida en la "Farmacopea Argentina", desarrollado total o parcialmente por A.N.M.A.T. – I.NA.ME. a través de ensayos colaborativos y avalado por dicha Farmacopea, cuyo empleo se reserva a ensayos químicos y físicos específicos en los que se comparan sus propiedades con las de un producto problema y que posee un grado de pureza adecuado para el uso al que se destina.

Programa de Sustancias de Referencia



Niveles y etapas del desarrollo

DSR 1: Selección de las sustancias a desarrollar

- Sintetizadas en la región.
- Que sean de interés sanitario.
- De rango terapéutico estrecho, con marcados efectos adversos, colaterales o tóxicos.
- Que presenten gran variabilidad en su actividad biológica.
- Nuevas no codificadas que tienen un consumo repentino y masivo por la comunidad.

DSR 2: Obtención de la materia prima

Origen

Pureza

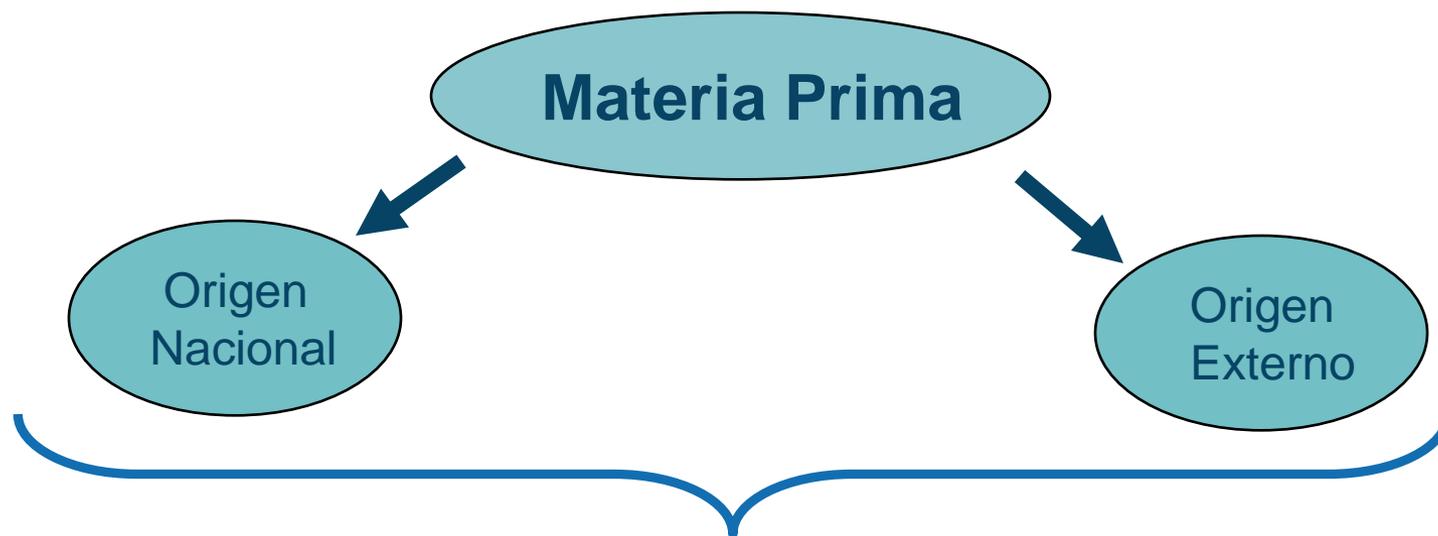
Documentación acompañante

Homogeneización y muestreo

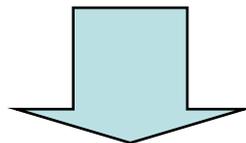
Método

Tiempo

DSR 3: Control de Aptitud



Aptitud físico-química



Ensayos codificados en la monografía de FA y otros adicionales.

DSR 3: Control de Aptitud

Consideraciones y precauciones en el análisis.

Redacción del informe interno.

Evaluación de los resultados.

DSR 4: Fraccionamiento

Manual

Condiciones

Sistema aislado

Humedad controlada

Protección de la luz

Temperatura controlada

DSR 4: Acondicionamiento y rotulado

Envases

- Frasco de vidrio inactínico
- Tapón de bromobutilo
- Precinto de aluminio

Rótulos:

Encabezado

Nombre de la Sustancia

Dirección

Contenido

Número de control / Número de lote

DSR 4: Inspección de las unidades fraccionadas

Ausencia de frascos con rajaduras
Cierre correcto del precinto
Ausencia de abolladuras en el precinto
Alineación del rótulo

Muestreo

La cantidad, depende de:

- Número de laboratorios participantes
- Cantidad necesaria para llevar a cabo los ensayos
- Número de determinaciones independientes

DSR 4: Almacenamiento

Temperatura controlada
Protección de la luz
Cierre hermético



Condiciones satisfactorias

DSR 5: Ensayos sobre la Sustancia fraccionada

Ensayos Interlaboratorio

Participación de Laboratorios oficiales

Servicio Materiales de Referencia

DSR 6: Evaluación y procesamiento de los resultados.

Informe de los resultados a los participantes.

Redacción del Informe Técnico y Certificado

DSR 7: Redacción del proyecto de Disposición para el establecimiento de la Sustancia de Referencia.

Elevación a la ANMAT.

Aprobación y Publicación en el Boletín Oficial.

DSR 8: Distribución interna y externa de la Sustancia de Referencia

Control de Estabilidad

Las Sustancias de Referencia son sometidas a reanálisis luego de un lapso de 5 años o menor, según antecedentes de la Sustancia.

VENCIMIENTO ???

No tienen asignada fecha de vencimiento.

Vigencia sujeta a los resultados de los reanálisis.

ESTÁNDARES DE IMPUREZAS

IMPORTANCIA

- CONTRIBUIR A LA FISCALIZACIÓN
- Aplicación en distintas metodologías analíticas



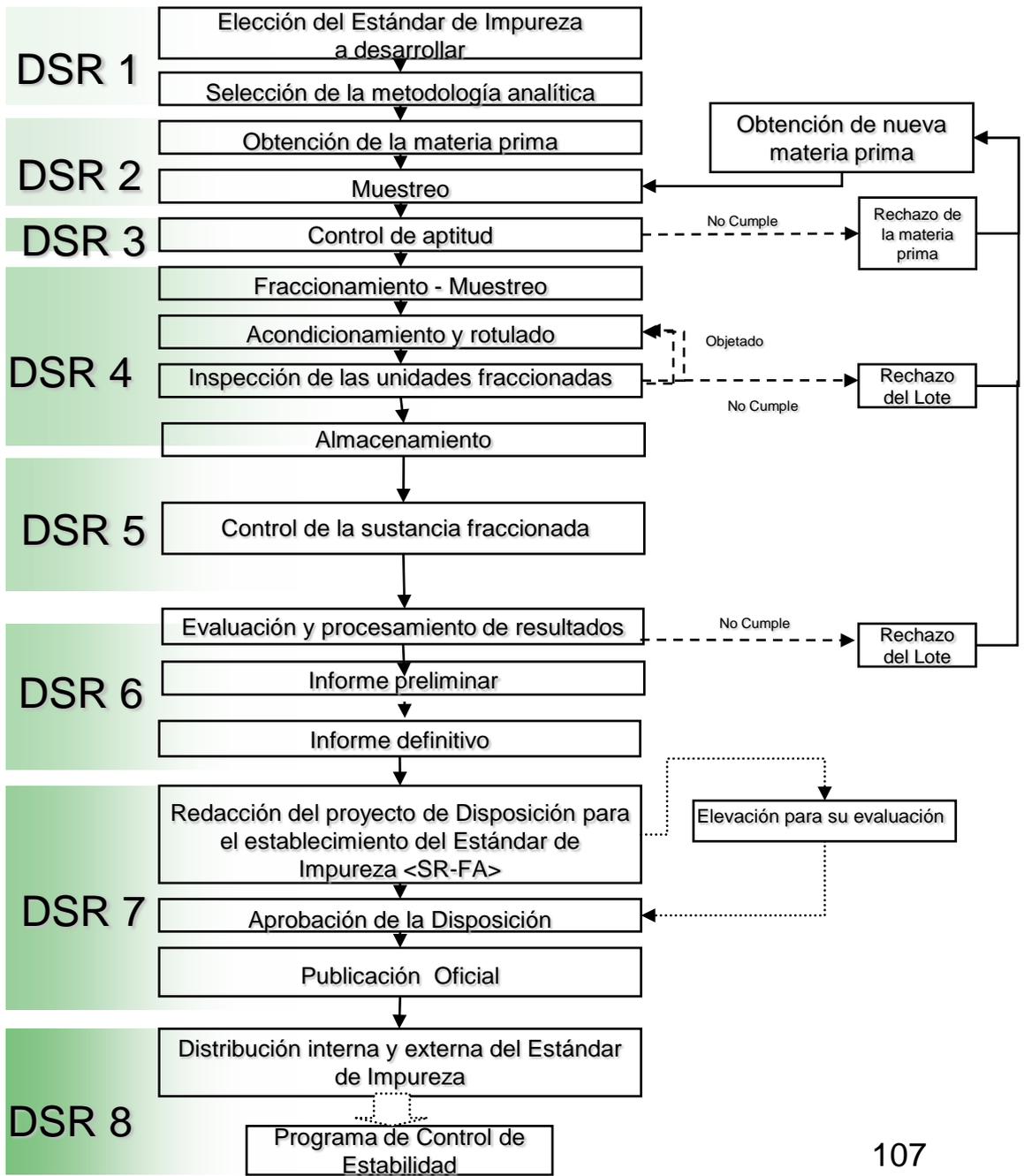
- Resolución
- Identificación
- Cuantificación
- Límite

DESARROLLO DE ESTÁNDARES DE IMPUREZAS

POSIBILIDAD / OBTENCIÓN

PUREZA

TOXICIDAD



Programa de Sustancias de Referencia

Niveles y etapas del desarrollo de Estándares de Impureza

DIFERENCIAS EN LAS ETAPAS Y NIVELES

- Cantidad de la impureza a requerir
- Selección de la metodología y ensayos a realizar
- Homogeneización
- Fraccionamiento
- Ensayo interlaboratorio ↔ Control de la sustancia fraccionada

DISPONIBILIDADES

Sustancias de Referencia:

- para Ensayos Físico-químicos
(FA y FA-FB)
- biológicas
- microbiológicas

- Aciclovir
- Ácido Salicílico Amiodarona Clorhidrato
- Amiodarona Clorhidrato, Impureza D
- Amiodarona Clorhidrato, Impureza E
- Amiodarona Clorhidrato, Impureza H
- Ampicilina
- Atenolol
- Bencidamina Clorhidrato
- Betametasona
- Bupivacaína Clorhidrato
- Cafeína
- Cefalexina
- Ciprofloxacino Clorhidrato
- Ciproheptadina Clorhidrato
- Cefadroxilo
- Cefazolina
- Cloranfenicol
- Cloranfenicol Palmitato "Polimorfo A"
- Clordiazepóxido
- Clorfeniramina Maleato
- Clotrimazol
- Dexametasona
- Dextrometorfán Bromhidrato
- Dextropropoxifeno Clorhidrato
- Diazepam
- Difenhidramina Clorhidrato
- Efedrina Clorhidrato
- Enalapril Maleato
- Enalapril Maleato, Imp. Dicotopiperazina
- Enalapril Maleato, Imp. Enalaprilat
- Enalapril Maleato, Impureza Imidazol
- Estreptomina
- Fenobarbital
- Fenilefrina Clorhidrato
- Furosemida
- Gentamicina
- Glibenclamida
- Gramicidina
- Heparina Bovina
- Heparina Porcina

- Hidroclorotiazida
- Ibuprofeno
- Ketoconazol
- Lidocaína Clorhidrato
- Loperamida Clorhidrato
- Lorazepán
- Mebendazol
- Metoclopramida Clorhidrato
- Metronidazol
- Nafazolina Clorhidrato
- Naproxeno
- Neomicina
- Nicotinamida
- Nifedipina
- Nimodipino
- Nistatina
- Norfloxacina
- Omeprazol

- Oxazepán
- Piridoxina Clorhidrato
- Piroxicam
- Propranolol Clorhidrato
- Ranitidina Clorhidrato
- Sulbactam Sódico
- Teofilina
- Tetraciclina
- Tobramicina
- Tioconazol
- Tioconazol, Impureza A
- Tioconazol, Impureza B
- Tioconazol, Impureza C
- Tioconazol, Impureza D
- Trimetoprima
- Vancomicina

En revisión - desarrollo

- Losartán Potásico
- Losartán, Impureza D
- Losartán, Impureza D
- Paracetamol
- Flutamida
- Fluconazol
- Ácido 6-aminopenicilánico
- Sulfametoxazol
- Metildopa
- Nitrato de Econazol
- Amoxicilina
- Ibuprofeno
- Clonazepam
- Loratadina
- Levodopa
- Clorhidrato de Diltiazem
- Sulfato de Salbutamol
- Citrato de Tamoxifeno
- Acetato de Ciproterona
- Fluorouracilo
- Azatioprina
- Citrato de Sildenafil
- Carvedilol

¡Muchas Gracias!

mdelmas@anmat.gov.ar

sr@anmat.gov.ar

Av. de Mayo 869
(C1084AAD), Buenos Aires - Argentina
(+54-11) 4340-0800 / 5252-8200

ANEXO VI

SIMPOSIO

"BIOQUÍMICA TRASLACIONAL Y VINCULACIÓN TECNOLÓGICA"

Jueves 21 de noviembre de 2013, de 14:00 a 18:00.

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956,

Sala de Conferencias "Pbro. Antonio Saenz", PP

Coordinador Acad. Dr. Juan Pablo Rossi

Buenos Aires – Argentina

14:00	Bienvenida por el señor Presidente de la Academia Dr. Carlos Baratti
14:05	Electroforesis bidimensional en Diabéticos Tipo 2 normoalbuminúricos, Bioquímica Laura Facio, Acad. Marco Pizzolato
14:30	Diagnóstico diferencial y vacunas profilácticas y curativas contra la enfermedad de Chagas, Dr. Emilio Malchiodi
14:55	Patentando la purificación de proteínas de interés comercial, Acad. Osvaldo Cascone
15:20	La participación académica en los nuevos desarrollos sobre kits inmunoanalíticos para el apoyo diagnóstico de la diabetes autoinmune. Dra. Silvina Valdéz, Acad. Edgardo Poskus
	CAFÉ
16:00	El camino desde la mesada a la industria, al comercio, a la sociedad: comentarios y desafíos, Acad. Alberto Díaz
16:30	Comentario editorial, Acad. Regina Wikinski
17:00	MESA REDONDA FINAL DE DISCUSIÓN (30 min) Dr. Hugo Sirkin , Secretario de Ciencia y Técnica de la UBA Ing. Santiago Sacerdote , Vicepresidente de Asuntos Tecnológicos, CONICET, Dr. Santiago Miguel Villa , Director de Vinculación y Desarrollo Tecnológico, CONICET
17:45	Entrega de diplomas a los académicos María I. Pita Martín, Ronaldo Meda y Sem Albónico. Entrega del premio Agustín Marenzi 2012

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN DIABÉTICOS TIPO 2 NORMOALBUMINÚRICOS

Bioq. María Laura Facio. Docente auxiliar del Departamento de Bioquímica Clínica, Laboratorio de Proteínas, INFIBIOC. Hospital de Clínicas José de San Martín Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Acad.Dr. Marco Pizzolato. Ex Profesor Titular Departamento de Bioquímica Clínica, INFIBIOC Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Director de Laboratorio, Centro de Hematología y Oncología Pavlovsky.

El método de Electroforesis Bidimensional combina la electroforesis en acetato de celulosa con la electroforesis en gel de poliacrilamida. Se aproxima a la tecnología emergente de la Proteómica que permite el análisis simultáneo de varias proteínas urinarias, siendo algunas de ellas identificadas por *immunoblotting* o espectrometría de masa.

En pacientes diabéticos tipo 2 normoalbuminúricos se observa la presencia de microproteínas Urinarias en el rango 68-25 kDa. Dichas proteínas están vinculadas al endotelio vascular, y podrían constituir un marcador urinario vascular-tubular renal de utilidad clínica en patologías sistémicas con riesgo cardiovascular y funcionalidad renal conservada.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y VACUNAS PROFILÁCTICAS Y CURATIVAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Dr. Emilio Malchiodi. Profesor Regular Titular de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Investigador Principal CONICET. Vicedirector IDEHU, CONICET-UBA.

Los medicamentos en uso contra la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, fueron descubiertos a mediados del siglo pasado, requieren largos tratamientos, presentan efectos adversos, no son eficientes en la enfermedad crónica y no se han aprobado otros desde entonces. La OMS recomienda el desarrollo de vacunas contra toda enfermedad infecciosa, sin embargo, no existen actualmente vacunas profilácticas ni curativas aprobadas contra la enfermedad de Chagas. Dado que en Latinoamérica hay superposición de áreas endémicas para *T.cruzi* y *Leishmania spp.*, es importante realizar un diagnóstico diferencial de las mismas. Nuestro grupo ha trabajado desde 1998 en la identificación de antígenos para el diagnóstico diferencial y con capacidad protectora contra la infección por *T. cruzi*. Se relatarán experiencias de vinculación tecnológica de los desarrollos realizados.

PATENTANDO LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE INTERÉS COMERCIAL

Acad. Dr. Osvaldo Cascone. Profesor Consulto Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Investigador Superior CONICET.

En esta comunicación se comentan las patentes del grupo de investigación dirigido por el Dr. Osvaldo Cascone en la Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Todas las patentes se refieren a la purificación de proteínas de interés comercial por métodos que pueden ser llevados a la escala industrial con rentabilidad positiva.

Los sujetos de los estudios fueron preferentemente subproductos y desechos industriales. Dichas fuentes fueron el suero del queso y las cáscaras de soja. También se estudiaron otras fuentes, como las lombrices, de las cuales podían extraerse proteínas de alto valor, y los sobrenadantes de cultivos celulares para la purificación de proteínas terapéuticas recombinantes.

Suero del queso

El suero del queso contiene proteínas minoritarias de alto valor cuya purificación contribuye a la valorización de este subproducto.

El grupo desarrolló matrices cromatográficas originales para la producción de lactoferrina y lactoperoxidasa a partir del suero del queso.

Cáscara de soja

La propuesta fue reemplazar la peroxidasa importada por peroxidasa extraída de la cáscara de soja en kits de diagnóstico médico. Para ello, se desarrolló un proceso de purificación competitivo basado en cromatografía de afinidad con un ligando peptídico extraído de una biblioteca combinatoria.

Pectinlisis

Las pectinasas son enzimas que hidrolizan la pectina y se utilizan industrialmente para mejorar la extracción de jugos de frutas. Los preparados comerciales de pectinasas están constituidos fundamentalmente por 3 enzimas: pectinesterasa, pectinlisis y poligalacturonasa. De ellas, la pectinesterasa libera metanol, que queda en el jugo y a largo plazo puede ser perjudicial para la salud. En el caso de los jugos concentrados el metanol se elimina en la etapa de concentración.

Nuestro grupo desarrolló un proceso basado en cromatografía con iones metálicos inmovilizados para eliminar selectivamente la pectinlisis de la mezcla comercial de pectinasas y así poder producir jugos sin metanol.

Lumbrokinasa

La lumbrokinasa es una enzima que se utiliza para disolver coágulos en casos de trombosis, infarto de miocardio, o simplemente como preventivo de la formación de coágulos. Como su nombre lo indica, se obtiene de lombrices, que son fuentes de bajo costo por alimentarse de desechos industriales.

En este caso se desarrolló un proceso de purificación basado en partición en dos fases acuosas y cromatografía de intercambio iónico.

Proteínas recombinantes

Especialmente para estas proteínas, hemos desarrollado la producción de matrices cromatográficas personalizadas, es decir matrices cromatográficas de afinidad basadas en un ligando específico para cada proteína. Esto se logra construyendo bibliotecas peptídicas combinatorias constituidas por miles de péptidos y seleccionando el más adecuado por su afinidad.

De esta manera, hemos desarrollado matrices cromatográficas personalizadas para varias proteínas recombinantes que se producen en nuestro país, como la hormona de crecimiento y FSH, además de una mejora para la purificación de eritropoyetina.

Se comentan los resultados de las gestiones para la transferencia de las patentes citadas.

LA PARTICIPACION ACADEMICA EN LOS NUEVOS DESARROLLOS SOBRE KITS INMUNOANALÍTICOS PARA EL APOYO DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES AUTOINMUNE

Dra. Silvina N. Valdez. Docente auxiliar de la Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Investigadora Adjunta del CONICET en el IDEHU, CONICET-UBA; Responsable del Laboratorio de Inmunoendocrinología, prestador de Servicios Tecnológicos de Alto Nivel, STAN-CONICET y en Vinculación con el Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas J. de San Martín, UBA

Acad. Dr. Edgardo Poskus. Director del IDEHU, CONICET-UBA.

La interacción entre los grupos académicos y la industria farmacéutica biotecnológica que se ha producido exitosamente en los países líderes, en alguna medida se ha dado en la Argentina. Los principales organismos oficiales locales que apoyan la investigación básica y aplicada, incluyendo las actividades de transferencia tecnológica y otros convenios académico-empresarios, son el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), dependiente del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva de la Nación y las Universidades Nacionales. En esos organismos existen registros detallados de tales vinculaciones y Memorias completas de las actividades realizadas.

Aquí se presentan algunas actividades de extensión realizadas desde hace dos décadas en la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (Cátedra de Inmunología e IDEHU, CONICET-UBA). Las mismas se realizaron en consonancia con el desarrollo original de autoantígenos recombinantes críticos, involucrados en la Diabetes mellitus Autoinmune. Los ejemplos más destacados son:

- i) La biosíntesis de la proteína de fusión entre la tiorredoxina y la glutamato decarboxilasa isoforma 65 KDa (Trx-GAD);
- ii) Desarrollo de la proteína tirosina fosfatasa tipo 2 asociada a insulinoma, dominio intracelular (IA-2ic);
- iii) Desarrollo de la quimera Trx-proinsulina (Trx-PI).
- iv) Obtención de una quimera del transportador de Zn, isoforma 8 (Trx-ZnT8).

Esos inmunobiológicos recombinantes tienen importantes aplicaciones analíticas para el apoyo diagnóstico y la detección precoz de la Diabetes mellitus tipo 1, insulino dependiente y en las formas autoinmunes de adultos (LADA) y pacientes infanto-juveniles (LADY).

Los servicios analíticos de la Cátedra de Inmunología e IDEHU, CONICET-UBA se realizan en vinculación con el Hospital de Clínicas o como Servicios Tecnológicos de Alto Nivel (STAN, CONICET) a toda la comunidad desde los propios laboratorios del sistema. Aún no han alcanzado la etapa de transferencia a adoptantes para ser convertidos en sistemas analíticos comerciales de baja complejidad y alta difusión en Bioquímica Clínica

El ámbito de la investigación nacional, sobre todo en aquellos institutos de dependencia compartida universitaria, y la estructura de soporte financiero oficial (ANPCYT, CONICET, UBACYT), brindan un razonable apoyo para la creatividad en distintas áreas científico-tecnológicas. Sin embargo, las etapas de difusión, potencial transferencia de nuevos desarrollos y el necesario asesoramiento en planes de negocio locales o regionales para cerrar el círculo de impacto práctico no tienen aún un vigoroso auxilio oficial por parte de las mismas instituciones que auspician eficientemente las etapas del desarrollo creativo original. Asimismo, desde la Dirección de Vinculación Tecnológica del CONICET, se ha brindado respaldo a otro proyecto relacionado, como es el desarrollo de insulina recombinante para la industria farmacéutica local.

EL CAMINO DESDE LA MESADA A LA INDUSTRIA, AL COMERCIO, A LA SOCIEDAD: COMENTARIOS Y DESAFÍOS

Acad. Lic. Alberto Díaz. Centro de Investigación y Desarrollo en Biotecnología Industrial – INTI y Universidad Nacional de Quilmes.

En la biotecnología, el sector salud humana (biofármacos, vacunas y sistemas diagnósticos) está marcado por su íntima relación con los avances de la investigación académica que afectan a la innovación industrial muy significativamente y también, a las políticas sanitarias. En nuestro país esto no es tan marcado por diferentes razones, sin embargo la existencia de un fuerte sector de investigación en biomedicina y una industria farmacéutica nacional, pueden ser la base para que esto ocurra. En la exposición mencionaremos características de la transferencia de tecnología en Argentina y se mencionarán algunos ejemplos para ver avances y dificultades.

COMENTARIO EDITORIAL

Acad. Prof. Titular Emérita Dra. Regina L. W. de Wikinski. Directora INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Ex Decana de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

En este simposio se destacan dos puntos de vista interconectados, la bioquímica traslacional y la vinculación tecnológica. El sistema científico argentino tradicionalmente se ha destacado por sus logros en ciencias básicas. En los últimos años se nota una extensión de las expectativas de los propios investigadores hacia la proyección de los resultados de sus trabajos para su aplicación a la resolución de problemas clínicos, químicos y biológicos en el campo de la bioquímica traslacional y la sistematización de sus laboratorios dirigidos hacia la vinculación tecnológica, que culmina en patentes nacionales e internacionales. Esas dos tendencias no son excluyentes, la bioquímica traslacional se orienta hacia la resolución de problemas complejos, partiendo de necesidades que se manifiestan en la evolución de los hallazgos en bioquímica, avanzando en el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos que requieren avances tecnológicos, hacia su aplicación en carácter de vinculación tecnológica facilitando su utilización en la Farmacología y en la prevención, la epidemiología y en la clínica médica y quirúrgica.

Los trabajos que se presentaron hoy tienen ese carácter, con acento en la numerosa y variada vinculación tecnológica en productos naturales, enzimas y proteínas recombinantes. El Acad. Cascone y su grupo realizan avances en el diseño de matrices cromatográficas para la separación de numerosas enzimas y proteínas recombinantes. Entre las numerosas enzimas estudiadas, es oportuno destacar la lumbrokinasa, una enzima que se utiliza para disolver coágulos en casos de trombosis e infarto de miocardio.

El recorrido en ciencias básicas induce al Acad. Poskus, mentor de la Dra Silvina Valdez y sus colaboradores hacia la elaboración de nuevos métodos patentables y patentados y su utilización en el diagnóstico de marcadores útiles para la clasificación de los pacientes en diferentes tipos de Diabetes. Todo ese trabajo ha llevado al Acad. Poskus a la constitución de un Laboratorio dedicado al tratamiento de los nuevos tipos de Diabetes mellitus, que es líder en el mundo médico especializado, evitando tratamientos inadecuados debido a la mala interpretación de la fisiopatología de base.

El Acad. Pizzolato y la Dra Maria Laura Facio son investigadores integrantes del INFIBIOC. La característica de este Instituto es su doble vinculación con el Hospital de Clínicas y diferentes Hospitales y la Facultad de Farmacia y Bioquímica. El Laboratorio de Proteínas dirigido por el Acad. Pizzolato fue pionero en Bioquímica traslacional, antes de que ese término se hubiese acuñado y sus trabajos en el desarrollo de métodos diagnósticos para estudiar diferentes disgamaglobulinemias, se expresan diariamente en la evolución metodológica, la cual es apremiada por los problemas clínicos que este laboratorio resuelve en el ámbito hospitalario y en Fundaleu, una institución privada dedicada a linfomas y leucemias humanas a partir de los estudios básicos de sus integrantes.

El Dr. Malchiodi y su grupo ven acertadamente la importancia epidemiológica de la Enfermedad de Chagas y sus trabajos, tanto básicos como aplicados en *T.cruzi* y *Leishmania spp*, permiten avizorar que este conjunto de investigadores del IDEHU será sumamente importante en la concepción de la enfermedad de Chagas, por suerte no olvidada por los investigadores citados cuando las vacunas preventivas y terapéuticas, tan necesarias, sean problemas resueltos.

Un ejemplo de este recorrido que cierra la brecha entre Ciencias básicas y la utilización terapéutica de los resultados vinculados a la tecnología es la presentación del Acad. Alberto Díaz, que participa en la resolución de una importante serie de problemas terapéuticos llevados a la práctica mediante procesos biotecnológicos.

CONFERENCIA DE INCORPORACION

DR. ALBERTO DIAZ

1. INTRODUCCIÓN

Las Academias fueron una “creación” del siglo XVII. Desde esos años surge un novedoso modelo de institución, señala L. Moledo en su Historia de las Ideas Científicas (1;a).

Al comienzo eran pequeñas asociaciones de personas con mucha curiosidad y deseo de investigar el mundo natural. La primera fue la Academia dei Lincei (Academia de los linces) de Roma, cuyo nombre se deriva de la aguda mirada de esos animales y fue fundada en 1603 por cuatro jóvenes inquietos. Luego siguieron otras, entre las más conocidas se encuentra la Royal Society de Inglaterra, la Academia de Ciencias de Francia, la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU. que este año cumple 150 años. En 1856, se crea la Asociación Farmacéutica y Bioquímica Argentina, origen de nuestra actual Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

Hoy existen Academias de Ciencias con sus especialidades en más de cien países del Mundo. La mayor parte de ellas se crearon para mejorar la ciencia y las comunicaciones entre sus miembros y en general a sus sociedades. Pero en los últimos años se fue evolucionando hacia un rol más activo para asesorar, advertir, informar, a sus países y gobiernos, especialmente por el acelerado avance de los conocimientos y sus aplicaciones tecnológicas en ciencias de la vida (biomedicina) (1;b). En esta línea se va orientando nuestra Academia, reflejando al mismo tiempo los avances y desarrollos en las ciencias de la vida.

En mi exposición voy a describir las características generales de la Biotecnología en Salud en los últimos 30/35 años, teniendo como eje de mi presentación algunos de los siguientes temas centrales, sobre los que he trabajado y sigo trabajando, para colaborar en la constitución de un fuerte sector de BioIndustrias, especialmente para el sector salud y farmacéutico, en nuestro país:

1 – Fortalecer el desarrollo y la producción biológica en las empresas nacionales del sector farmacéutico (Medicamentos y vacunas).

2 – Creación y desarrollo de Nuevas Empresas de Biotecnología (start up, spin off) que se relacionen como cadenas productivas con las anteriores.

3 – Fabricación / Producción (manufacturing): fortalecer y desarrollar este sector, especialmente desarrollos productivos a escala de Planta Piloto. Además de establecer la tecnología necesaria de producción, estas Plantas permiten obtener materias primas para desarrollos galénicos, estudios clínicos y farmacológicos, manteniendo una estrecha relación con los sectores de I y D.

4 – Transferencia activa de Tecnología: incorporar a las industrias los conocimientos que se generan en nuestro sector académico (Universidades, CONICET, Institutos).

5 – Recurso Humano: formar “BioIngenieros” y Biofarmacéuticos de producción, una combinación del biólogo molecular con el ingeniero.

6 – Responsabilidad social (Bioética): por el material con que se trabaja, ADN, ARN, proteínas, células madres, y sus aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico (secuenciamiento de ADN, diagnóstico pre – implantación embriones humanos, terapia génica, terapias celulares), se requiere de una muy alta responsabilidad en el trabajo, sobre todo que serán empresas industriales quienes van a desarrollar, producir y comercializar estos nuevos productos.

7 – Regulaciones, Financiamiento, Propiedad Intelectual: temas esenciales y generales que no voy a desarrollar por ser más conocidos y contar el país con muy buenos especialistas en estos temas. Solo haré alguna mención si fuera necesario en el texto.

FUNDAMENTALMENTE VOY A ENFATIZAR los cuatros temas en los que estoy trabajando desde hace casi 40 años:

- a) Biotecnología y Nuevas Empresas Innovadoras
- b) Nuevos conocimientos y Transferencia de Tecnología desde el sector académico al industrial.
- c) Bioprocesos (BioManufacturing).
- d) Desarrollo de la Biotecnología Industrial en Argentina.

2 – Biotecnología en el sector salud: sus características.

2.1. Novedades en las BioCiencias: algunos pocos ejemplos.

Se puede leer en Science el 7 de febrero de 2013 el trabajo titulado: “Non – coding Repeats cause peptide clumps”. Los autores demuestran que los agregados proteicos en los cerebros de ciertas personas con demencia o enfermedad neuromotora, tienen un origen sorprendente: una secuencia repetida de ADN que se pensaba no codificaba proteínas, es la fuente de cadenas de proteínas insolubles que se agregan en las células cerebrales de los pacientes, que posteriormente desarrollaron ciertos tipos de neurodegeneración. Es un primer paso para entender el mecanismo y tratar de resolver estas patologías.

Epigenética: en Science Translational Medicine (23/1/13) se publica: “DNA methylation alterations exhibit intraindividual stability and interindividual heterogeneity in prostate cancer metastases”. Los cambios post-transcripción han comenzado a ser revelados, entendidos y a veces regulados. Ya hay empresas biotecnológicas que desarrollan biofármacos en base a los estudios epigenéticos.

Incyte, empresa de biotecnología de Estados Unidos, logró la aprobación por la FDA de su producto Jakafi (ruxolitinib), una molécula pequeña para el tratamiento de una enfermedad rara de la sangre, la mielofibrosis, y otros desórdenes mieloproliferativos. Esta molécula no sólo es la primera para esta enfermedad, sino que es la primera que Incyte coloca en el mercado

Terapia Génica: Beta Talasemia. “Gene - therapy hope for Beta – thalassaemia patients. A defective haemoglobin gene has been successfully replaced with a healthy copy”. Publicado en Nature Septiembre 2010.

HEPARINAS: Trabajo publicado en Science (28/10/2011) : “ Hemoenzymatic synthesis of homogeneous ultra – low molecular weight heparins”

Las heparinas son productos clásicos y necesarios de la industria biológica extractiva; difíciles de reemplazar por síntesis química o biológica durante muchos años. Los investigadores logran una síntesis enzimática de una heparina de bajo peso molecular, de la misma seguridad y eficiencia al actual anticoagulante que se comercializa en el mercado internacional, el “fondaparinux”, pero esta heparina de bajo peso molecular es más pura y su producción es más económica. Uno de los autores, R Linhardt, es profesor de Biocatálisis e Ingeniería Metabólica en el Rensselaer Polytechnic Institute de EE.UU. Redujo los pasos para su elaboración en un 80%, respecto del proceso anterior.

“Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly”, Nature 9/8/12. Los avances en genómica y proteómica están permitiendo caracterizar en profundidad la microbiota intestinal (antes denominada flora intestinal) y determinar la relación entre los alimentos, nuestras bacterias y nuestro organismo. Los cambios de la microbiótica están en el origen de enfermedades inflamatorias y metabólicas de nuestro intestino. Este tipo de estudio abre nuevos y fuertes oportunidades a la industria de la alimentación y a las farmacéuticas, poniendo nuevamente en primer plano el término NUTRACEUTICOS, comprendiendo el mecanismo y usos potenciales de los probióticos.

2. 2. Creatividad y Biotecnología.

Las novedades mencionadas en 2.1, son algunos ejemplos actuales de los que, en los últimos 30 años, han estado marcando los mayores avances en los temas de investigación biomédica, pero cuya transformación en productos para la salud, sigue siendo todavía hoy en día, un gran desafío. Junto con ellos, mencionamos algunas empresas y centros tecnológicos nuevos, también como ejemplos de las instituciones necesarias para que los resultados de la ciencia lleguen a la sociedad.

Estos impactantes resultados de la investigación en ciencias biológicas podrán ser realidad, algunos de ellos, solo a través de largos procesos de investigación, desarrollo y fabricación de esas moléculas a escala industrial, que incluye realizar los estudios clínicos y farmacológicos necesarios para llegar al uso en pacientes. Este es el campo de la Biotecnología dentro de la industria farmacéutica o en las industrias de la salud, que ha modificado las características de este sector industrial en todo el mundo.

Para tener solo una fotografía de estos cambios es suficiente ver que las ventas globales de proteínas recombinantes terapéuticas alcanzaron en 2010 un estimado de 107 Bn de USD (Bn, significa mil millones) (2); ese mismo año 30 productos biofarmacéuticos tuvieron ventas de más de 1 Bn de USD cada uno de ellos, llegando Enebrel (etanercept) a ventas de 7, 3 Bn de USD; el crecimiento anual del sector es de 14 % anual y ya ocupa el 15/20 % del mercado mundial de medicamentos. Pero estos datos comerciales son solo la superficie de los impactos provocados respecto de la salud de la población, de las políticas sanitarias, de la aparición de nuevas e innovadoras empresas que trasladan el acelerado avance de las investigaciones en ciencias de la vida, en biomedicina en especial, a la sociedad.

La Biotecnología, es una tecnología, entonces, es una actividad industrial. Muy relacionada con la investigación “básica”, con una frontera cada vez más difusa especialmente con la biología molecular, PERO ES UNA ACTIVIDAD QUE LLEVAN ADELANTE EMPRESAS, sobre todo innovadoras y con alta inversión en Investigación y Desarrollo.

No es Biología Molecular, aunque la utiliza intensivamente; no es solo clonación de genes. Sí, insisto, es tecnología “ciencia intensiva”.

Por esta razón, el Recurso Humano es el factor esencial para su desarrollo: desde el biólogo molecular, al bio-ingeniero, al bio-farmacéutico, a nuevos gerentes, nuevos empresarios.

“BIOTECNOLOGÍA Y SURREALISMO”

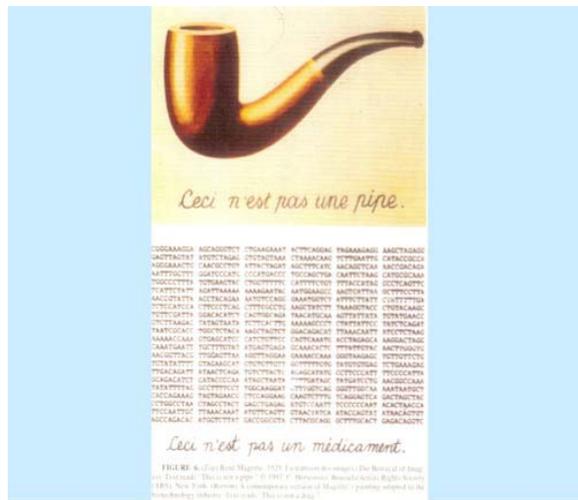
Joseph Goldstein, Premio Nobel de Medicina (1985), compara a los pintores surrealistas con su ideal de poder construir nuevos objetos y personas (nuevo mundo), inventar nueva realidad, con la biotecnología.

“..... A continuación voy a exponer sobre la industria biotecnológica, focalizando en sus sueños y sus realidades para la medicina del siglo XXI. Gran parte del éxito de la revolución biotecnológica puede ser atribuido al estilo operativo de esta industria. Los biotecnólogos han asumido un estilo que recuerda a una revolución en el arte a comienzos del Siglo XX, llamada surrealismo. Como los artistas del surrealismo de las décadas de los '30 y '40, los más creativos científicos en la actualidad viven y piensan en un mundo de fantasía y sueños.” (3).

Es cierto que desde estas apreciaciones de Goldstein han pasado unos 20 años, donde a los sueños se le han sumado productos, nuevas tecnologías, acciones de bolsa y millones de dólares. Pero, así son las industrias y sus negocios. Por suerte la Biotecnología en el sector salud sigue manteniendo una fuerte presencia de “soñadores”, es decir, de nuevas ideas, innovaciones.

En su exposición Goldstein, resalta que una secuencia de ADN NO ES UN MEDICAMENTO, puede ser un primer paso para ello, pero hace falta muchísimo trabajo y tiempo que será realizado por cantidad de personas para terminar finalmente en su fabricación industrial en una empresa farmacéutica, si es que se tiene éxito en esos 10 años de trabajo. Con fina ironía Goldstein recuerda a los científicos, los biólogos moleculares, que no todo está definido en esa secuencia. Al igual que los surrealistas que mostraban un cuadro de una pipa, titulando ESTO NO ES UNA PIPA (es su representación). La secuencia de nucleótidos de un gen,

NO ES UN MEDICAMENTO. (Figura 1).



Continúa Goldstein, “Afortunadamente, no es posible acelerar el proceso para descubrir nuevos medicamentos (moléculas) de manera similar a como ilustra el cuadro de Magritte denominado “Clairvoyance. El artista, Magritte, está observando un huevo, pero él está pintando un pájaro que está implícito en el huevo. Esta “prescience” es exactamente lo que los científicos del futuro necesitarán aprender a hacer: mirar (¿leer?) la secuencia de ADN, deducir la función de la proteína y producir un nuevo medicamento (molécula). Los científicos del futuro deberán funcionar más y más como artistas, que miran a algunos amorfos, mal definido, fenómenos abstractos de la naturaleza y crean un objeto de belleza. Un mayor desafío para los investigadores básicos será aprender cómo moverse rápidamente de la secuencia de ADN a las funciones de las proteínas...”

Agregamos, que ese desafío deberá ser llevado en conjunto con los bioingenieros de producción y con los biofarmacéuticos.

Entre varios ejemplos históricos de esta también íntima relación entre descubrir – inventar una molécula y el necesario desarrollo productivo e industrial, conviene recordar el descubrimiento de la Penicilina por Alexandre Fleming (4,a) en 1929: sus esfuerzos poco exitosos para lograr producir algunos miligramos de la molécula parcialmente pura para poder conocer sus características, su estructura y poder usarla en la clínica. Pero recién en 1941, esto se pudo hacer al encarar Florey y Chain (4,b), con la destacada colaboración del bioquímico Norman Heatley, la producción desde un punto de vista industrial y bioquímico. Hicieron sus primeros desarrollos en Gran Bretaña y luego debieron viajar a EE.UU. donde había plantas industriales para poder llevar la producción en escala. En esos años Inglaterra estaba muy absorbida por la Segunda Guerra Mundial. Los tres primeros recibieron el Premio Nobel en 1945.

Similar a lo que sucedió con el Premio Nobel que obtuvieron Watson, Crick y Wilkins por haber determinado la estructura del ADN, pero que no le fue otorgado a Rosalind Franklin, que había realizado gran parte del trabajo experimental que fueron base para la publicación de Watson y Crick.

Poco más de cincuenta años más tarde (1998), Henry Harris, quien fue el sucesor de Florey como profesor de Patología en la Universidad de Oxford, recordaba: “ Sin Fleming, no hay Chain o Florey; sin Chain , no hay Florey; sin Florey no hay Heatley; sin Heatley, no habría penicilina”.

Resumimos los factores que permitieron el desarrollo de la penicilina industrialmente porque, fueron y pueden ser ejemplo para otros desarrollos productivos de medicamentos, biofármacos: 1) “suerte” por parte de Fleming por no haber tirado sus cápsulas de Petri contaminadas y, sobre todo, SABER MIRAR. Cómo decía Louis Pasteur la suerte acompaña a los espíritus preparados; 2) situaciones históricas: en este caso las dos grandes guerras mundiales. La Primera llevó a Fleming a trabajar, investigar, sobre antisépticos y como tratar las infecciones. La Segunda Guerra Mundial llevó a que los gobiernos de Inglaterra y EE.UU. financiaran la producción de la penicilina por la obvia importancia estratégica y sanitaria; 3) Equipo de trabajo: se necesitó la

intensa colaboración de Florey, Chain y Heatley para llegar a tener éxito el descubrimiento de Fleming; 4) participación de los Gobiernos: el gobierno inglés apoyó especialmente los trabajos de Florey y luego el de EE.UU. con la producción; 5) participación industrial: apoyados por los gobiernos, las industrias farmacéuticas existentes llevaron a gran escala industrial los procesos desarrollados por los bioquímicos; 6) nueva cepa de *Penicillin:P. chysogeum* producía 200 veces más que la *Penicillin notatum* original de Fleming. Posteriores selecciones y mutaciones realizadas por el equipo de Florey, obtuvieron una cepa 1.000 veces más poderosa que la original de Fleming.

Al final de la Segunda Guerra Mundial, las industrias de EE.UU. estaban fabricando 650 billones de unidades de penicilina por mes, contra las 400 unidades obtenidas entre enero y mayo de 1943.

2. 3. Industrias Biotecnológicas.

“Al comienzo de 1997, la industria biotecnológica (no solo en salud) de USA estaba formada por 1,287 compañías, que empleaba a 118,000 personas, aproximadamente un tercio de ellas son doctores (PhD). ... El mercado de capitalización de la industria es de 83 Bn USD, la venta de productos es de 11 Bn USD y los gastos de I y D son de 7,9 BN de USD. La industria biotecnológica representa la nueva industria que crece más rápidamente en nuestra sociedad, pero a diferencia de McDonald y la industria microelectrónica, no ha logrado todavía ganancias. La pérdida neta de la industria de manera global fue de 4,6 Bn de USD en 1996.”. “ ... Las 1.287 compañías son (aclaración: en términos económicos, comerciales) el equivalente de una gran empresa como Merck & Co. Esta emplea 100.000 personas y una venta de productos de 11 Bn de USD y con un mercado de capitalización de 50 Bn de USD: su ganancia anual es de 8 BN de USD. Uno puede pensar a toda la industria biotecnológica como un gran Merck, pero sin ganancias o aún un Big Mac sin ganancias ¡!!!” (3).

Sin embargo en esa fecha las empresas de biotecnología en salud, junto a las farmacéuticas asociadas, habían desarrollado y comercializaban 17 proteínas recombinantes y vacunas aprobadas por F.D.A. (Food and Drug Administration). La que más se vendía era la EPO (eritropoyetina), integraba el grupo de medicamentos que se llaman “blockbuster”, es decir que tiene un mercado superior a 1 Bn de USD y era, en 1996/ 1997, LA SEXTA EN VENTAS DEL MERCADO FARMACÚTICO TOTAL. Los cuatro biofarmacéuticos más vendidos (EPO, GCSF, vacuna hepatitis B e insulina), estaban entre los 20 medicamentos más vendidos de toda la industria farmacéutica.

En la Tabla 1 se muestra, a partir de las ventas de los años 2005/6, un estimado del mercado para el 2010, que se ha ido cumpliendo. Con esta Tabla queremos enfatizar la continuidad y el crecimiento del mercado de los biofármacos, es decir nuevos productos (recordando lo de Goldstein y los surrealistas: sueños que se hacen realidades) y su utilización.

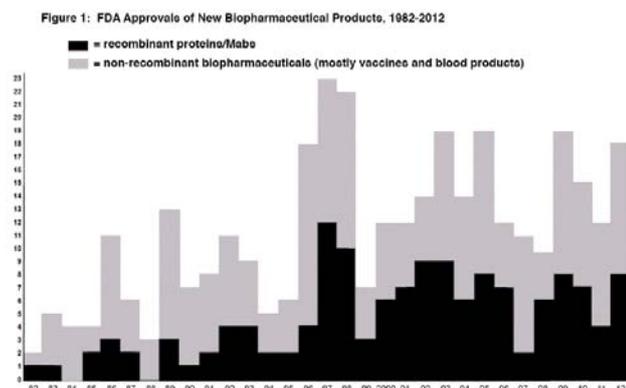
TABLA 1. Mercado estimado de proteínas Terapéuticas en 2010, basado en las ventas de los Medicamentos Biológicos más vendidos.°

Categoría	2005 (en Bn USD)	2006 (en Bn USD)	2010 proyectado (en Bn USD)
Anticuerpos Monoclonales	17,3	23,1	41,2
Epoetinas	11,2	12,0	12,8*
Insulina (y relacionadas)	7,6	9,0	13,0
Interferones	6,4	6,8	7,7
Antifibrinolíticos	4,1	4,5	6,3
Inmunoestimulantes (CSF)	3,9	4,3	5,5
Hormonas de Crecimiento	2,2	2,4	2,5
Otros (mecanismos mixtos)	2,9	3,2	4,7
Totales	55,6	65,3	93,7

(°): Proyecciones para 2010, tomadas de las ventas del 2005 y 2006 de las ventas de los 70 biológicos actualmente en el mercado, excluyendo las vacunas. De Strohl, WR et al “Therapeutics MAB from bench to clinical” 2009.

(*): Proyecciones realizadas antes de algunos de los problemas de seguridad a mitad de 2007. que bajaron las

En la Figura 1, se muestran los Biofarmacéuticos aprobados en los últimos 30 años en la FDA, tomado de “FDA Biopharmaceutical Product Approval and Trends: 2011” de Ronald Rader (5), del Biotechnology Information, donde se comprueba la existencia constante de nuevos biofármacos recombinantes y también de otros biológicos.



En el mismo artículo se muestran los medicamentos aprobados durante el 2011:

Table 2. FDA Full Biopharmaceutical Approvals in 2011**

Product	Company	Date	Indication
VEGF Trap, rDNA (Eylea)	Regeneron Pharmaceuticals Inc.	11/18/2011	age-related macular degeneration
Asparaginase/Erwinia (Erwinaze)*	EUSA Pharma Inc.	11/18/2011	acute lymphoblastic leukemia
Cord blood stem cells (Hemacord)	New York Blood Center, Inc.	11/10/2011	hematopoietic stem cell transplantation
CD30 mAb, rDNA--monomethyl auristatin E (Adcetris)*	Seattle Genetics, Inc	8/19/2011	Hodgkin's lymphoma
Scorpion antitoxin/immunoglobulin, equine (Anascorp)*	Rare Disease Therapeutics Inc.	8/3/2011	scorpion stings
Fibroblasts, autologous (laViv)*	Fibrocell Science, Inc.	6/22/2011	nasolabial fold wrinkles (smile lines)
CTLA4-Ig, rDNA (Nulojix)*	Bristol-Myers Squibb	6/15/2011	kidney transplant rejection
Albumin, human (Kedbumin)*	Kedrion, S.p.A.	6/3/2011	multiple albumin supplementation indications
CTLA-4 Mab, rDNA/Medarex (Yervoy)*	Bristol-Myers Squibb	3/25/2011	melanoma
Adenovirus Type 4, 7 Vaccine Live, oral (Ardovax)	Teva Pharmaceuticals	3/16/2011	vaccination of U.S. military personnel only
B-cell-activating factor Mab, rDNA (Benlysta)	Human Genome Sciences Inc.	3/9/2011	systemic lupus erythematosus
Factor XIII, human (Corifact)*	CSL Behring	2/17/2011	Factor XIII deficiency

Links are to records in the [BIOPHARMA: Biopharmaceutical Products in the U.S. and European Markets](#) Web database.

*orphan designation (8 total)

**Full BLAs excluded from consideration include biologics routinely manufactured by local/regional blood centers (e.g.. Plasma. Red Blood Cells) and those approved as diagnostics. e.g.. allergy test antigens.

Con la Tabla 2 y la Figura 1 quiero remarcar la continuidad y el crecimiento constante de la biotecnología en este sector. De los varios análisis que se puede obtener de la Tabla 2, queremos remarcar la aparición de las terapias celulares, la aprobación de una vacuna para uso militar (un sector fuertemente financiado e innovador) y un producto elaborado y registrado por una empresa de México, Anascorp. Este último marca la necesidad de este tipo de productos como necesidad social y que, además, tiene amplio mercado. Uno de los posibles modelos para nuestro país?.

El “modelo biotech” (6) de generación de nuevos productos y tecnologías fue llevado adelante en los ’70 por científicos de muy alto nivel, para explotar las innovaciones en biología y desarrollar nuevas moléculas terapéuticas. La base del modelo está especialmente dado por la íntima relación academia – universidad e investigadores que junto a empresarios crean y han creado nuevas e innovadoras empresas como lo señalaba Goldstein más arriba. Ha provocado un gran cambio en la estructura de la industria farmacéutica para incorporar la biología molecular y la biotecnología.

En general ese modelo se ha desarrollado en varios países, pero fundamentalmente en EE.UU. por distintas razones (inversiones fuertes en biomedicina; escuelas de investigación comprobables por el alto número de Premios Nobel de medicina o química; existencia de capitalistas de riesgo muy activos; fuerte industria farmacéutica) y es lo que Arthur Konberg denominó “La Hélice dorada y las aventuras tecnológicas” (7) donde hace la historia, razones e impactos de las nuevas empresas de biotecnología. Respecto de estos últimos remarca “Las “aventuras biotecnológicas”, con sus características únicas, hacen irremplazables contribuciones a la ciencia y al crecimiento de las Naciones”.

2. 4. Aportes de la Biotecnología para la Industria Farmacéutica.

En el cuadro siguiente resumimos los principales beneficios que introdujo la Biotecnología en el sector de la salud humana, tanto para la industria como la medicina y las políticas sanitarias.

<p>Producción de proteínas humanas para uso terapéutico</p> <p>Producir dichas proteínas a escala industrial</p> <p>Productos más seguros y controlables</p> <p>Producción de proteínas y otras macromoléculas para diagnóstico</p> <p>Procesos productivos más económicos</p> <p>Nuevas Vacunas</p> <p>Nuevos sistemas de diagnósticos</p>
--

Hasta comienzos de la década de los ’80, esto era imposible. Fue y sigue siendo posible por la investigación en biomedicina realizada desde la década de los ’50 y, tal vez como un nuevo fenómeno en las ciencias de la vida, la aparición constante de Nuevas Empresas de Biotecnología íntimamente relacionadas al sector académico que transforman los nuevos conocimientos en productos para la sociedad. En esta exposición no profundizo las características de estas empresas innovadoras porque me alejan del tema, pero su organización y funcionamiento hacen a los éxitos (en algunos casos fracasos) logrados, cuyo eje esencial es el de unir el conocimiento (“expertise”) del científico innovador con el del empresario innovador: lograr que ambos tengan el mismo idioma, de manera que el gerenciamiento sea abierto y democrático, que permita a los profesionales de las empresas mantener el alto nivel creativo del ámbito académico.

Los ejemplos de los primeros biofármacos son muy demostrativos de esta “revolución” en la industria farmacéutica: a) Insulina Humana reemplazando la de origen extractiva por sus potenciales efectos posteriores provocado por agentes contaminantes (virus “lentos”, priones) o efectos reales como alergias en algunos

pacientes; b) EPO, eritropoyetina: hubo micro producciones sobre todo en nuestro país para estudios y estándares internacionales pero fue imposible hacer tratamientos a pacientes hasta que se pudo clonar y expresar el gen de la EPO en células animales; c) IFN, interferón: se hacía la producción a partir de leucocitos humanos, los países exitosos fueron Finlandia, quien originó la tecnología y posteriormente, Cuba. Pero esa materia prima tiene el problema de su obtención en cantidad y asegurar calidad y bioseguridad. (el caso del IFN representa el, el tal vez, mayor aporte de la biotecnología: su impacto en la investigación “básica”. Se conocieron no menos de 25 IFN diferentes, otras linfoquinas, permitió estudiar sus mecanismo de acción, hacer estudios farmacéuticos y farmacológicos); d) la HCH, hormona de crecimiento humana: en nuestro país el grupo dirigido por el Dr Alejandro Paladini de la Facultad de Farmacia y Bioquímica era el centro productor de dicha hormona para sus investigaciones sobre estructuras y mecanismos y para tratamientos de pacientes en el Hospital de Niños de Buenos Aires; e) En los últimos 15 años se produjo un gran salto con la elaboración de Anticuerpos Monoclonales (Ac Mc) para uso terapéutico: algo imposible de pensar hasta el gran aporte de nuestro compatriota César Milstein; fundamentalmente para usos en oncología pero también para enfermedades autoinmunes, trasplantes de órganos, etc.

Las vacunas son unas de las principales medidas preventivas en medicina sanitaria. Las vacunas “tradicionales” consisten de bacterias o virus, atenuados o muertos, que en algunos casos pueden producir efectos secundarios pero sobre todo necesitan específicos procesos de producción y medidas de bioseguridad en las plantas de procesos.

La moderna biotecnología permite producir específicamente el antígeno o los antígenos específicos que son los que desencadenan la respuesta inmune (Hepatitis B, HPV) y hacerlo de manera segura, sin riesgos para el que elabora el producto como para los pacientes. De todas maneras hay que tener en cuenta que la respuesta inmune por parte del organismo animal es compleja y la elaboración de un producto para vacunar no es sencillo: no se han podido reemplazar la mayor parte de las “tradicionales” vacunas existentes (y tampoco se justifican económicamente), por lo que hay que mantener ambos tipos de productos para lograr objetivos sanitarios: “tradicionales” y “modernos”. Se sigue trabajando en las mejoras de las vacunas existentes, como es el caso de la vacuna contra *B. pertussis*, por ejemplo.

3 – FABRICACIÓN / BIOFABRICACIÓN (MANUFACTURING).

3.1 – Programa Superior de Fabricación – EE.UU.(Advanced Manufacturing Programme).

En junio de 2011 el Presidente de EE.UU., B. Obama, se refirió por primera vez al nuevo programa nacional para promover las asociaciones industriales y desarrollar nuevos procesos de fabricación. El Advanced Manufacturing Programme (AMP) tiene como objetivos convertir a las industrias manufactureras en un sector nuevamente competitivo y crear más empleo de alto nivel en EE.UU. Esta iniciativa es continuación de la publicación en junio 2011 de los Consejeros Científicos del Presidente (PCAST) que manifestaba una situación de alarma respecto de la industria manufacturera en EE.UU. especialmente la relacionada con la alta tecnología Ese sector es de importancia estratégica para el país ya que representa el 12 % de su PBI (160.000 Millones de USD) y más del 11 % de los empleos (8).

Los Consejeros mencionan “...existen tres razones urgentes por los que debemos revitalizar nuestro liderazgo en las fabricaciones (manufacturing): 1) Manufacturing, basadas en las nuevas tecnologías incluyendo herramientas de alta precisión y materiales de avanzada, provee la oportunidad para trabajadores de alta calidad y puestos de trabajo bien pagos; 2) un fuerte sector de fabricación que adapte y desarrolle nuevas tecnologías es vital para asegurar el liderazgo de EEUU. La innovación es la resultante de las sinergias que se crean al ubicar los procesos de producción y los de diseño cercanos unos con otros; y , 3) Las capacidades domésticas de fabricación usando tecnologías y técnicas avanzadas, son vitales para la seguridad nacional”

La industria de EE.UU está muy volcada hacia la innovación porque allí van los 2/3 de los gastos privados en I y D, pero es un sector que ha sido desde 2009 superado por China y Alemania. De alguna manera el informe establece que el país sufre del síndrome “inventado acá, pero producido en otros lugares”, que se refiere sobre todo a las industrias informáticas, de computadoras, de células solares, robóticas; la AMP intenta que estas vuelvan a fabricarse en el país y que las próximas tecnologías innovadoras y dominantes, no sigan el camino de fabricarse afuera.

Si bien no es el caso de Argentina la preocupación de que nuestras empresas fabriquen en el exterior, esta preocupación de EE.UU. sobre el “manufacturing” permite ver la importancia del tema en el momento que estamos desarrollando, o pensamos en hacerlo, empresas productoras de biofármacos.

3.2 - RETOMANDO LAS IDEAS EN ÉPOCAS DE CRISIS.

A raíz de la fuerte crisis del 2008/9 en EE.UU., Gary Pisano (9) economista especializado en las nuevas tecnologías sobre todo en la biotecnología, critica el “outsourcing” (externalización) y plantea la necesidad de volver a la fabricación en el país.

- “Décadas de fabricación “outsourcing” han dejado a la industria en EE.UU. sin los medios para inventar los productos “high tech” de nueva generación, que re-construirían su economía”.
- “Restablecer la capacidad de las empresas para desarrollar y fabricar productos de “high-technology” es el único camino que se puede aspirar para que sus ciudadanos eleven su nivel de vida”
- Continúa Pisano: “Sofisticadas capacidades de fabricación e ingeniería que son base para las innovaciones en un amplio rango de productos, rápidamente también se han ido”.
- “Entonces los EE.UU. perdieron o están por perder el conocimiento, personal capacitado (con habilidades) y la infraestructura de proveedores necesarios para fabricar muchos de los productos de frontera que se inventan”

“Porqué la fabricación (la producción) tiene importancia??”, se pregunta Suzanne Berger (10). La fabricación no es solamente el poder ofrecer puestos de trabajo (lo que ya no es menor). La nueva generación de innovaciones tecnológicas está íntimamente relacionada (unida) a los procesos de producción”.

Suzanne Berger es una de las investigadoras del estudio del MIT publicado en 1989 “Made in USA” (11) sobre las características de las industrias manufactureras de EE. UU. y sus debilidades frente a Japón, Alemania etc; ha seguido preocupada por el tema durante todos estos años, no solo en EE.UU. sino en otros países como Francia, Corea, China, etc

Entre 2000 y 2010 los puestos de trabajo en las fábricas en EEUU, disminuyeron en un 34 %, algo más de 6 Millones de personas ¡!!!!!! (si cada una de ellas puede ser un drama personal y una pérdida social invaluable, cuanto serán 6 millones????).

Si bien EE UU sigue siendo uno de los más poderosos productores, fabricantes, está levemente por debajo de China. La pérdida de esos puestos de trabajos (sumado a la grave crisis financiera desde el 2008), según investigaciones recientes, se ha debido en parte al aumento en la productividad, pero también a las grandes importaciones desde China. Hay que mantener estas políticas? Fortalecer servicios o retornar a las producciones?

“Pero en los últimos 25 años se ha producido un gran cambio en la estructura de producción, la digitalización y la “modularity” (modularidad) hicieron posible separar la Investigación, el Desarrollo y el

diseño de la producción en las industrias donde estas funciones estaban anteriormente integradas dentro de las corporaciones. Las experiencias de las firmas exitosas en los últimos 30 años hacen posible pensar que la producción industrial puede ser “outsourced” y “offshored” sin ningún daño a los motores de la innovación” (10).

Los casos más emblemáticos son los de Apple, Bell, Cisco, pero también Texas Instruments y Hewlett – Packard. En general resultó para las TI (Tecnologías de la Información) que dieron la base para este paradigma del cambio industrial que se vivió en los últimos años. Sin embargo los trabajos de la Comisión del MIT, Production in the Innovation Economy Commission, sobre empresas dedicadas a la energía eólica y solar, a la biotecnología, nuevos materiales, baterías y otras tecnologías emergentes, sugieren varias razones para cuestionar si el paradigma de las TI son adecuadas para ellas. Esta investigación estaría demostrando que “los desafíos del scaling up de estas actividades desde los laboratorios y las starts ups a la producción final de gran escala de los nuevos productos y servicios son diferentes de los temas de las empresa de soft y electrónicas en su transición de la “idea al mercado”. Y no solo se debe a que estos sectores requieren de mayor capital para el escalado que en el soft, sino que es también crítico no tener integrados la IyD, diseño junto a la producción (e inclusive con el marketing y post marketing)(10).

Los investigadores, los ingenieros en desarrollo deben estar muy cerca de la producción para desarrollar nuevas estrategias de manera de contar con procesos más eficientes y también responder a las necesidades de los consumidores, los clientes, en una estrategia nueva de considerar a estos últimos como parte importante del proceso y no solo como COMPRADORES .

3.3. Biofabricaciones / BioProducciones (Biomanufacturing).

Un caso especial del “manufacturing” es el “biomanufacturing”, muy especialmente para la elaboración de medicamentos en base a la biotecnología. “The biomanufacturing process is complex and has been referred to more as an “art rather than a science,” though it is becoming more science than art as time goes on” (12). Como en la industria farmacéutica hay dos tipos de fabricación de medicamentos (“drugs”), denominados como fabricación primaria y secundaria. Al hablar del biomanufacturing nos referimos a los dos, es decir al más complicado que es el de obtener el API (Active Pharmaceutical Ingredient) o producto a granel, pero también al producto final, es decir a su formulación para uso en pacientes como píldora o inyectable, estabilizantes, dosis, forma de liberación; esta parte galénica todo un desafío por trabajar con macromoléculas, lo que demanda personal altamente capacitado y en constante actualización.

La “biofabricación” requiere especial atención por parte de la industria, viendo que, por ejemplo, en 2008, aproximadamente el 30% de los ingresos por ventas de los primeros 100 medicamentos en el mercado internacional fueron de biológicos y se espera que lleguen al 50% en el 2014/15. Estos datos no sólo son de alto interés y preocupación para las empresas, sobre todo para las “big pharma”, sino también para los organismos de Gobierno de todo el mundo relacionados a las políticas sanitarias, necesariamente muy relacionadas a las industrias manufactureras.

El crecimiento del mercado mundial de los biofármacos es de un 14/15% por año, lo que va a significar la necesidad de cuadruplicar las capacidades existentes de producción de los biomedicamentos en el mundo. El estudio realizado por la LEEM, Les Entreprises du Médicament, (www.leem.org) en el 2005 y actualizado en el 2008, manifiesta claramente las especificidades de las actividades de *bioproducción* que, para varios analistas del sector, son asimilables a las actividades de investigación: utilización de conocimientos (competencias, expertises) de muy alto nivel; fuertes inversiones; intervienen tempranamente y en relación con la comercialización.

Para Francia, LEEM establece junto con Genopole – Ivry, cuatro ejes: 1) asegurar la producción de lotes para estudios clínicos; 2) favorecer la creación de uno o varios establecimientos de producción de lotes

comercializables; 3) sostener un proyecto nacional de asociación público / privado para la investigación sobre los bioprocedimientos y, 4) desarrollar la formación y las competencias específicas en la bioproducción.

Desarrollar la producción de biomedicamentos en el país (Francia) representa un tema crucial para asegurar a los enfermos un acceso rápido a los medicamentos, responder a necesidades de la salud pública y también al desarrollo económico. Será necesario también, desarrollar un plan estratégico nacional para el empleo y la formación de recursos humanos adecuados y establecer una acción conjunta entre las empresas y el Ministerio de Educación para identificar y adaptar los programas de formación que ya existen a nivel nacional. “El objetivo es de mejorar la accesibilidad para los estudiantes de las carreras de formación en biotecnología, incluyendo de manera específica la bioproducción”.

La fabricación de estas macromoléculas, para el uso en la medicina, presenta un desafío a los fabricantes, pero que tanto en EE.UU., en UE o en Argentina han sido dominados y que con cada ola de las tecnologías deben afrontar nuevos desafíos.

Si bien se podría coincidir con C. Love ingeniera química que integra el Biomanufacturing Research Program (BioMAN) del MIT, que “en cada momento que usted produce en un biorreactor, el resultado puede ser un poco diferente”, provocando con esta variabilidad que el proceso sea más caro y a veces no predecible. Sin embargo se pueden fijar pautas y calidades para que esto disminuya casi a cero el riesgo, llevando a que el producto final sea siempre el mismo. La experiencia de fabricación y comercialización en Argentina y Cuba, por dar dos ejemplos, lo demuestran, si bien no se puede dejar de lado el desafío, el riesgo y extremar los controles de calidad en procesos y luego en productos.

Por estas razones las agencias regulatorias no solo controlan y aprueban las moléculas, los productos, sino también su proceso de fabricación (manufacture).

El BioMAN tiene por misión desarrollar innovadoras herramientas y tecnologías que reduzcan el costo de los procesos de fabricación y aumentar nuestra capacidad para liberar productos biofarmacéuticos seguros de alta calidad.

Otro modelo a considerar para facilitar el desarrollo de los bio – medicamentos y de nuestras industrias, es el del Centro para Fabricación (Manufacturing) Innovadora en las Terapias Macromoleculares Emergentes. Este Centro Nacional tiene como foco transferir innovaciones de investigaciones en bioproducciones para fortalecer los desafíos que se enfrentan el sector biofarmacéutico de Inglaterra.

El Centro pertenece al University College London (UCL) en colaboración con el Imperial College London. Los colaboradores académicos son el Department for Biochemical Engineering, the Department for Chemical Engineering and the School of Pharmacy at UCL and the Department for Chemical Engineering at Imperial College.

El Departamento de Biochemical Engineering tiene como objetivo “Bringing Discoveries to Life” (“Llevando los descubrimientos a la vida”).

“Los avances en las ciencias de la vida tienen el potencial de proveernos de mejores medicinas y un ambiente más limpio. Es el trabajo del Ingeniero Bioquímico llevar a escala estos descubrimientos que facilitarán estos cambios a nuevos productos y procesos.

“The only thing enabling a biotherapeutic drug to be delivered to the patient is manufacturing” – A. Sinsky MIT Professor Biology and CBI Faculty Director(“ “El único tema que hace posible que un medicamento biológico, biofármaco, pueda ser liberado para el paciente, es la producción, la fabricación (en la industria)”.

3. 4 – Centro de Investigación y Desarrollo en Biotecnología Industrial – INTI.

Las consideraciones anteriores, más las realidades de Argentina, presentan ideas para fortalecer y desarrollar activamente la biotecnología industrial en el país. Es lo que nos llevó a plantear y construir una Planta de Bioprocesos que trabaje en ese espacio ubicado entre el pasaje del laboratorio a la planta industrial.

Hemos tenido muy en cuenta los factores que determinan las inversiones para el “biomanufacturing” (no hablamos solo para el sector de biofármacos) y la relación estrecha entre innovación y producción, por ejemplo, no separar el upstream del downstream y tener cerca la producción de los sectores de Investigación y Desarrollo.

El Centro de investigación y Desarrollo en Biotecnología Industrial del INTI tiene como principal objetivo el desarrollo de los bioprocesos, siendo esto una de las carencias que existe en el país para consolidar el sector de la Biotecnología Industrial, es decir fortalecer la capacidad de producir un bien o procesos de interés industrial. (13).

La Biotecnología Industrial incluye la Tecnología de Fermentación (cultivos celulares) y la de purificación de macromoléculas como etapas productivas. En tal dirección, esta nueva área del INTI tiene como herramienta central la Planta de Bioprocesos de microorganismos. La misma fue diseñada con el objetivo de poder trabajar con un amplio rango de microorganismos y procesos para aplicaciones diferentes que van de la fabricación de medicamentos y aditivos para alimentos a procesos industriales en general. Para ello cuenta con una superficie cubierta de aproximadamente 350m² más una superficie similar para el área de servicios, equipada con un sistema de presión diferencial con filtros de aire absolutos, que permiten mantener protegido tanto el ambiente como los productos que allí se desarrollan.

De tal modo, a través de esta Planta, el Instituto incorpora una herramienta de importancia que busca apoyar las iniciativas de base biotecnológica, tanto del sector público como privado, mediante la realización de desarrollos productivos y su posterior transferencia a empresas y otros organismos del Estado.

Actualmente, Marzo 2013, está en construcción avanzada otra planta de bioprocesos para cultivos de células animales, en especial desarrollo productivo de Anticuerpos Monoclonales. Se espera esté en funcionamiento en el segundo semestre de 2014.

Ambas Plantas han recibido, además del apoyo y financiamiento del INTI (Ministerio de Economía), el financiamiento de diferentes programas específicos del MINCYT, como FONTAR, PRIETEC, FONARSEC.

Algunos de los proyectos que actualmente están en desarrollo son el asesoramiento técnico en el escalado productivo de bioinsecticidas altamente específicos (insecticidas biológicos) para una empresa nacional ; el desarrollo de enzimas (elaboradas por las técnicas de ADN recombinante) destinadas a la industria de la alimentación, higiene y textil, entre otras; purificación de biofármacos en conjunto con empresas nacionales; desarrollo de levaduras para tratamientos de vinazas y obtención de moléculas para sectores industriales (en colaboración con ICIDCA de Cuba).

En otro orden, dentro del marco de un convenio con el CONICET, se está trabajando en conjunto con un grupo de investigación de la UBA y otro de la UNQ para escalar dos proteínas recombinantes allí desarrolladas, que tienen aplicaciones en cicatrizaciones, antiinflamatorios y, probablemente, antiinfecciosos y en oncología.

Por último, el Centro de Biotecnología Industrial tiene entre sus socios fundadores un alto número de empresas farmacéuticas y de biotecnología en el área de la salud, lo que permite visualizar un fuerte desarrollo público-privado en el sector, con alto beneficio y fortalecimiento del sistema sanitario argentino

Por ello el Instituto asume el desafío de participar activamente en el desarrollo y uso de esta tecnología. Desde el Centro de Investigación y Desarrollo en Biotecnología Industrial, a través de su Planta de Bioprocesos, el INTI apunta a la realización de desarrollos productivos tomando en consideración aspectos técnicos, económicos, legales y regulatorios, para luego llevar a cabo su transferencia a empresas y organismos del Estado.

Se ha comenzado con la Facultad de Ciencias Exactas de la UBA un curso anual de formación en Biotecnología Industrial, C.E.B.I., sabiendo que este recurso humano está faltando y será necesario para nuestras empresas y las futuras empresas innovadoras de biotecnología que van a incorporar el conocimiento que se genere a nivel nacional. En el 2013 el CEBI se dicta por tercera vez.

En la misma dirección se establecieron acuerdos de cooperación Sur-Sur (con Cuba y Sudáfrica) y también Sur-Norte (por ejemplo con el ICGEB de Trieste) para mantenernos actualizados y ganar tiempos. También estamos trabajando con científicos y tecnólogos argentinos que se encuentran en el exterior para ampliar nuestras tecnologías y lograr hacerlas de manera más rápidas y eficientes, recuperando sus conocimientos.

4 – Panorama de la Biotecnología en el sector salud en Argentina.

El desarrollo de la biotecnología industrial en nuestro país comienza en los primeros años de la década de 1980, sobre todo en medicamentos y reactivos diagnósticos con empresas nacionales que incorporan muy tempranamente la tecnología, al integrar científicos y tecnólogos provenientes del sector académico, de otras empresas y de investigadores que regresaban al país. Hay que aclarar que las empresas se pudieron desarrollar, dominar tecnologías básicas moleculares, de producción, comercialización, etc., en aquellos tiempos en un ambiente libre de leyes de patentes para los medicamentos, por la existencia de recursos humanos en biomedicina y por la presencia de una industria farmacéutica nacional (14).

La industria farmacéutica en nuestro país presenta rasgos distintivos – fuerte presencia de empresas de capitales nacionales, importantes gastos en actividades de investigación y desarrollo (I&D), marcado dinamismo del mercado en los últimos años - que la posicionan como uno de los sectores más destacados dentro del entramado industrial. Su desenvolvimiento es el resultado de una interrelación sumamente compleja entre esferas del ámbito productivo y organizativo de los laboratorios, del marco regulatorio y lapolítica de prestación de servicios de la salud pública, y de la comunidad científica, entre otros.

Esta vinculación entre los diferentes actores que conforman al sector se evidencia en varios aspectos. Uno de ellos es la estricta regulación sobre la elaboración de medicamentos, que implica el cumplimiento de una serie de requisitos específicos en materia de calidad de producto y procesos, dado que su producción está orientada en su amplia mayoría al cuidado de la salud humana.

En la Tabla 3 se muestran las características generales de las empresas nacionales relacionadas a la salud, considerando que estas empresas son más empresas de producción biológica que empresas que usen las técnicas de la biotecnología moderna.

TABLA 3 - ARGENTINA: indicadores generales de las empresas de Biotecnología, año 2008 – 2009. (adaptada a las empresas de salud)(en miles de pesos; porcentajes y miles de dólares).

Actividad	Nº de Empresas	Ventas Biotecnológicas miles pesos	Ventas Biotec/Totales %	Exportación miles USD
Salud Humana	24	273.295	19	43.736
Fertilización asistida	22	116.633	100	0

Fuente: CEPAL; datos de la Segunda Encuesta Nacional de Empresas de Biotecnología. (14).

Los principales grupos o empresas especializadas en biotecnología son el Grupo Amega Biotech (que integran Zellteck, Gema Biotech); BioSidus y el Grupo Chemo que agrupa entre otros a Romikin, PharmADN, Elea. Las 24 que se mencionan en la Tabla no son todas productoras de biológicos, algunos de ellos desarrollan y la mayor parte comercializa.

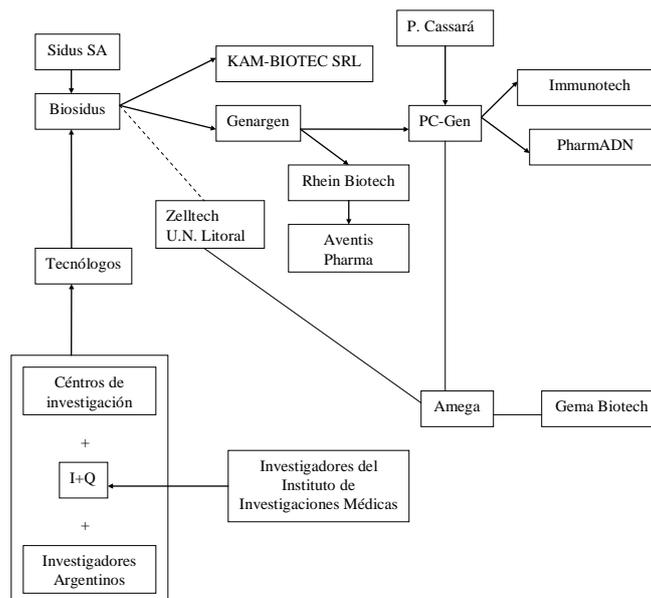
Llama la atención la importancia de las empresas (clínicas) de Fertilización Asistida; es cierto que no son productoras de medicamentos pero si utilizan técnicas y profesionales de alta preparación para sus servicios. También marca el recurso humano que contamos en el país.

A diferencia de lo que sucede a nivel internacional, la industria farmacéutica argentina (recordar la mutua necesidad entre empresas de biotecnología en salud y empresas farmacéuticas) no presenta una estructura integrada que vaya desde la idea o la investigación hasta la producción y comercialización. No obstante esto, le permite tener un dominio de mercado, algo más del 50% de las ventas y, sobre todo, tener plantas de alta capacidad para elaborar medicamentos en sus diferentes formulaciones. Esto no es de menor importancia ya que, a partir de una industria del medicamento, se puede pensar en empresas *biotech* innovadoras que integren una cadena con las “farmas”, desarrollar y fortalecer ese sector industrial, abastecer el mercado interno con medicamentos de calidad, a precios razonables, exportar y ser un instrumento para políticas sanitarias.

En la Ilustración 1 presento un resumen de la formación de las empresas de biotecnología en el sector de medicamentos o en general en salud. Se puede comprobar que el origen está fuertemente marcado por Sidus SA y lo que fue en su origen el área de Biotecnología de Sidus a mitad de 1980; que, por las características de la especialidad, el personal altamente especializado (investigadores y tecnólogos) y la necesidad de contar con una organización de empresa adecuada a esta nueva tecnología, los llevó a crear BioSidus dos o tres años después. Este exitoso emprendimiento tuvo su antecedente en la empresa Inmunoquemia, hoy podríamos decir un “spin off” del Instituto de Investigaciones Médicas a comienzos de la década de los ’70, especializada en la elaboración de reactivos para inmunodiagnósticos y materias primas para la industria farmacéutica: nuevamente se encuentran los tecnólogos – investigadores – empresarios y las empresas farmacéuticas nacionales.

Un desprendimiento de profesionales de BioSidus a comienzos de los ’90 formó Genargén que junto a la farmacéutica Pablo Cassará , integró Pc – Gen que comenzó a elaborar y comercializar los biofármacos iniciales: interferón, EPO, etc,

Algunos emprendimientos que no contaron con el suficiente apoyo financiero y organizativo de organismos oficiales (década de los ’90) ni empresas de mayor capacidad, a pesar de haber progresado en el mercado, terminaron abandonando el proyecto (ejemplo KamBiotech).



Observando esta ilustración, que muestra el papel de núcleo de BioSidus en épocas que no había

adecuados financiamientos y leyes promocionales, es esperable que dentro de unos 10 años (2020 – 2025) en función de las medidas que toma el MINCYT para promover la innovación tecnológica (FONTAR, EMPRETECNO, FONARSEC), se tenga un esquema con varios núcleos (como ya comienzan a asomar) y además mucho más “denso” de cuadros y empresas, sobre todo a través de cadenas de valor que favorezcan la internacionalización de nuestra industria biofarmacéutica utilizando la generación de los conocimientos de nuestro sector académico (eliminando o disminuyendo de esta forma la “blind technology transfer” (15).

La empresa BioSidus tuvo en sus comienzos (1982/83) una estrategia basada en el dominio de tecnologías, contando para ello con el recurso humano “bio-industrial” necesario. Un origen diferente es el de la empresa Gema Biotech, con fuertes inversiones en laboratorios, equipos y personal. No comercializó productos en el mercado nacional hasta hace pocos años, integrando el grupo Amega Biotech, pasando a ser hoy uno de los dos grupos industriales en el sector “farma” con gran capacidad de producción, innovación y comercialización.

El Centro de Hemoderivados de Córdoba –que pertenece a la Universidad Nacional de esa provincia– es un exitoso ejemplo de empresa del Estado que cumple un muy importante rol social por el tipo de productos que elabora para el país y para la región y, además, es económicamente rentable.

Una estrategia diferente, innovadora y de competitividad internacional, es la seguida por el Grupo Chemo, de origen nacional, relacionado en la Argentina con las empresas ELEA y Romikin, constituyendo en la actualidad el grupo empresario más innovador, junto con Amega Biotech, de biotecnología en la industria farmacéutica, dado que está realizando estudios clínicos internacionales de nuevas moléculas. Comenzaron un trabajo de largo plazo con los principales centros de biotecnología de Cuba y con laboratorios de universidades nacionales de nivel internacional, como la UBA y la UNQ. Las políticas de la empresa le permitieron tener moléculas originales y realizar estudios clínicos internacionales, estando actualmente en estudios de Fase II y Fase III en algunos productos, lo que ha determinado que establezcan laboratorios y oficinas en Europa, en los Estados Unidos y en China, sobre todo por las investigaciones clínicas, farmacológicas, registros de productos, financiamientos. Integra también Sinergium Biotech, en un principio asociada a Novartis, para elaboración de vacunas y fabricación de anticuerpos monoclonales con plantas ya en funcionamiento en la Pcia. de Bs.As. ES EL PRIMER LABORATORIO (GRUPO) NACIONAL QUE ACABA DE APROBAR EN A.N.M.A.T. un medicamento que ha surgido de la investigación de una universidad nacional, la Universidad nacional de Quilmes y también aprobar en ANMAT y en el Ministerio de Salud de Cuba, el primer medicamento surgido de una colaboración Sur – Sur en América Latina, como es el Racotumomab.

En la Tabla 4 he agrupado a las empresas según sus características dentro de la industria de los biofármacos (las que comercializan son solo algunas de las que lo hacen, tampoco se mencionan los laboratorios internacionales porque, salvo Aventis para la vacuna de hepatitis B, no fabrican ni desarrollan en el país).

Tabla 7: Empresas Biotecnológicas seleccionadas de Argentina: Salud Humana, clasificación según sus actividades.

Desarrollo y Producción de proteínas recombinantes	<i>BioSidus . Zelltek Gema Biotech Aventis (Sanofi Pasteur) PharmADN Inmunova</i>
Desarrollo y Comercialización.	<i>Elea Romikin Gema Biotech Dosa</i>
Comercialización	<i>Kampel Martian Sidus Pablo Cassará Bioprofarma G.P.Pharma Gador</i>
Ingeniería de tejidos	<i>Craveri Hospital Italiano</i>
Diagnóstico	<i>Wiener Biocientífica PolyChaco P.B.L. Britannia</i>
Productoras de proteínas por Procesos Extractivos	<i>Laboratorio de Hemoderivados-UNC Laboratorios Beta</i>

Fuente: Libro "Biotecnología y Desarrollo", más elaboración en base a datos propios e informaciones del sector privado.

¿Cómo hacer ahora, en el siglo XXI? ¿Es posible algo similar a los emprendimientos de la década de los '80 y comienzos de los '90? Es destacable la opinión del empresario Hugo Sigman, para quien "la actividad empresarial, desde los años '50 hasta hoy, sufrió una involución" (16). Se refiere a la desaparición de la capacidad de fabricación en materias primas farmacéuticas, capacidad industrial-empresarial, y plantea una nueva visión y actividades para empresarios y Estado. De alguna manera lo que planteamos bajo el título "Bioprocesos". Ejemplo de Sinergium Biotech para vacunas y para anticuerpos monoclonales, junto a otros emprendimientos del Grupo Omega, van en este cambio de dirección.

Los desafíos de la biotecnología, como los de todas las nuevas tecnologías, requieren un esfuerzo mayor debido a sus potenciales efectos sociales y éticos (bioética). En este sentido debe ser tenido muy en cuenta el ejemplo de las Abuelas de Plaza de Mayo en su largo e intenso trabajo para lograr identificar a sus nietos, hijos de los desaparecidos, recurriendo a los científicos para que resuelvan ese drama personal y social (17). La demanda social (i!) ha permitido, además de ayudar a solucionar el terrible problema de identificar a los hijos de los militantes de los '70 (los desaparecidos), generar tecnología desarrollada por científicos argentinos e internacionales y que ahora es tecnología que exportamos (en especial por lo que realiza el Equipo Argentino de Antropología Forense).

Para todo lo anterior será necesario facilitar la creación de empresas innovadoras, impulsar activamente la transferencia de tecnología del sector académico hacia esas empresas y hacia empresas establecidas, pero muy especialmente formar recursos humanos especializados en biotecnología, es decir, en lo que tiene que ver con la producción industrial, lo que incluye regulaciones, economía, ventas, temas legales, temas éticos y de manera muy especial algo en lo que la Argentina es débil: tener capacidad de gerenciamiento/gestión (tanto en lo privado como en las instituciones oficiales) en ciencias de la vida con la responsabilidad ética y social requerida. En síntesis, hay que hacer política activa para el sector.

5. BIOTECNOLOGÍA EN Y PARA PAÍSES EN DESARROLLO.

El Centro de Bioética de la Universidad de Toronto – Canadá, liderado por Peter Singer (18) realizó una encuesta entre expertos de todo el mundo en temas de ciencias de la vida aplicada a la salud para conocer cuáles serían los 10 Principales temas a desarrollar en el sector de la Biotecnología en salud para los Países en Vías de Desarrollo. A continuación mencionamos los resultados obtenidos de la misma:

“TOP TEN” DE BIOTECNOLOGÍA EN SALUD PARA PAÍSES EN DESARROLLO

- 1 – Tecnología molecular para enfermedades infecciosas.
- 2 – Tecnología de ADN recombinante para vacunas.
- 3 – Tecnología para suministrar y liberar vacunas y biofármacos.
- 4 - Tecnología para mejorar y cuidar el medio ambiente.
- 5 – Secuenciamiento de genomas de patógenos.
- 6 – Protección de la mujer a través de control y mejoras de enfermedades sexualmente transmisibles.
- 7 – Bioinformática para estudios y desarrollo de medicamentos y estudiar interacciones huésped – patógenos.
- 8 – Plantas transgénicas (OGM) con nutrientes específicos
- 9 – Tecnología ADN r para biosimilares
- 10 – Química combinatoria.

Se puede concluir que de las diez prioridades en biotecnología en salud para los países en desarrollo, los tres primeros puestos fueron para tecnologías moleculares en métodos sencillos y económicos para diagnóstico de enfermedades infecciosas, en segundo luego para usar la tecnología de ADNr para vacunas y el tercero contar tecnologías para mejorar el suministro de vacunas y medicamentos. No obstante los avances de las ciencias de la vida son constantes y en paralelo lo hace la biotecnología, como se está produciendo con la genómica, proteómica, células madres (en general medicina regenerativa), biología sintética. Son temas que hay que incorporar dentro de las prioridades de la biotecnología en salud.

Confirmando estos resultados es lo que se puede comprobar en las reflexiones de Agustín Lage acerca de lo realizado en Cuba en biotecnología para salud, luego de casi 20 años de trabajos e inversiones. Escribió en el 2002 (19): “Connecting immunology research to public health: Cuban biotechnology” (Conectando la investigación en inmunología con la salud pública: Biotecnología cubana), que podría ser extendida a las ciencias biológicas en general y no solo a la inmunología.

“Qué es lo que la investigación en inmunología puede hacer y que un país chico requiere? La respuesta simple es MUCHO, si la investigación en inmunología es para tener efecto tangible sobre la salud de la población” (nuevamente aconsejo para nuestro caso reemplazar inmunología por ciencias de la vida).

“**Biotecnología es el ‘connecting device’**. Cómo fue construída la conexión entre la investigación en inmunología y la salud pública?. El principal puente conectando ambas actividades es la biotecnología. Esto no era inesperado dado que 70% de los productos en desarrollo actualmente son inmunológicos. De los 418 productos incluídos en la encuesta del 2006 publicada por la Pharmaceutical Manufacturers Association(<http://www.phrma.org/files/Biotech%202006.pdf>), los anticuerpos, las vacunas, los inmunomoduladores y las citoquinas, suman 289. La Industria Biotecnológica ha permitido fabricar moléculas biológicas con la pureza, reproducibilidad y en escala productiva, como se hace con los farmacéuticos clásicos.”

“Conclusiones: la investigación en inmunología está creciendo y se está transformando en un tema global (internacional), pero los puentes que unen la ciencia a la salud pública (y también con la economía) son todavía principalmente locales. El proceso de construir estas conexiones locales no es espontáneo ni trivial y es por eso que es necesario ser enfatizado en este artículo”

6. De cabras y conejos a genes y bioreactores: rol del Petit Café.

Mi amigo de siempre, Horacio, culto conocedor de casi todo y de todos, determinó mi cambio de aspirante a investigador en fisicoquímica en tercer año de la facultad, hacia las ciencias biológicas, más específicamente hacia la bioquímica, cuando me ofreció un trabajo para compartirlo, como técnico en el laboratorio de reumatología e inmunología de la Liga Argentina – Israelita contra la Tuberculosis. Año 1963, tal vez 1964. El laboratorio era dirigido por un científico “loco”, creativo al máximo, recién llegado de EE.UU. Tenía un fuerte “grant” (en esa época ignoraba que era eso, pero parecía, obviamente, muy importante: nada menos que el financiamiento para poder trabajar y nosotros cobrar nuestro salario ¡!!!!) para trabajar en estudios sobre origen y posibles tratamientos en reumatología y por eso nos pasábamos haciendo el famoso “latex fixation test” en todos los sueros de los pacientes que venían a la consulta.

Lo cierto es que con Horacio cobraríamos lo que hoy podrían ser \$ 1.000 (unos 200 USD) y nos encontrábamos en el famoso, en aquellos años, Petit Café en Santa Fé casi Callao. Él venía desde su casa en la zona Norte y yo de la mía, en la zona de Montserrat (¿?). Desayunábamos y luego en taxi nos íbamos a trabajar todas las mañanas, como se imaginarán el sueldo se iba casi todo en esas actividades. Pero aprendimos mucho y nos apasionábamos con los resultados, sin saber muy claramente que significaban. El jefe técnico del laboratorio era un sabio químico, de gran paciencia con nosotros, el Dr S. Laizerovich, especialista en preparar antígenos para vacunas contra la alergia, que vendía otra persona que era la más dinero ganaba, obviamente.

Además del laboratorio de la Liga, trabajábamos en el laboratorio de reumatología del Hospital Fernández donde “Finki”, siempre inquieto, era el médico de la sección y donde hacíamos electroforesis en papel (proteinogramas) con una artesanía y calidad pocas veces vista. Pero teníamos un densitómetro para hacer las cuantificaciones (¡!!!!) y no tener que cortar el papel, eluir con ácido acético y luego leer en un fotolorímetro. Aclaro que Finki era un innovador e investigador de nivel, entre muchas cosas (patentes obtenidas, “papers” etc) fue el creador del CIMAE y luego del CIMATEC.

Por amistades, me llega la oportunidad de ingresar en 1965 en el Instituto Nacional de Microbiología, “el Malbrán” hoy integrante de ANLIS, en el Departamento de Virus Nuevo, donde se trabajaba casi exclusivamente en el Virus Junín (Virus de la Fiebre Hemorrágica Argentina). Creo que el de Virus Viejo era el que trabajaba en rabia y otros “viejos” virus. Era la época inmediatamente “post Pirotzky”, habían sido cesanteados investigadores y el director y otros renunciaron en adhesión en episodios conocidos y relatados en varios libros y artículos. Entre los renunciantes estaba César Milstein que había creado en 1960 el Departamento de Biología Molecular en el Malbrán cuando había 5 / 6 en todo el mundo. Casi 10 años después de su renuncia, publicó en Nature (¿?) su “descubrimiento” de los AcMc (anticuerpos monoclonales) y casi 20 años más tarde de su renuncia obtenía el Premio Nobel.

Volviendo al Malbrán y el Depto de Virus, el Instituto seguía con muy buenos investigadores, varios de ellos recién llegados de estadías en el exterior. Trabajé durante tres años en la purificación del Virus Junín bajo la dirección de la Dra Z. Martínez Segovia. Fue un laboratorio y Depto. de gran formación para todos los estudiantes y técnicos: desde la bioquímica a los cultivos celulares, las pruebas en animales. En microscopía donde sobresalía otro sabio, el Dr. Pablo Bozzini. El virus Junín no tenía todavía vacuna y menos drogas antivirales. GLP? Flujos laminares? Laboratorio P3 o P4? Eran “altri tempi”, la propipeta de goma era la “alta seguridad”. Desde la década de los '50 que había aparecido la enfermedad en el Norte de la Pcia de Buenos Aires, hasta estos años de mi formación, habían fallecido algunos investigadores que trataban de aislar e identificar el agente viral. Durante mi estadía en Virus Nuevo, falleció un joven técnico del cual me había hecho amigo, sin poder saber cómo se había contagiado: seguramente los “virus volaban” en las gotas cuando uno centrifugaba u homogeneizaba los cerebros de ratón en el “Blender”. Lo cierto que el trabajo y la creatividad de todo el Depto era notorio en investigación y sobre todo en los servicios que se hacían. Llegamos a publicar dos trabajos, obviamente la honestidad de mi jefa me hizo figurar en el “paper” siendo yo el que hizo el trabajo técnico. Estas publicaciones fueron, entre otras cosas, las que me permitieron posteriormente entrar al CONICET.

Pero como aquellas cosas vividas en la infancia que nos marcan, la inmunología, la inmunoquímica, las estructuras de los anticuerpos y las inmunoglobulinas, me atraían. Nuevamente por amistades me entero que el Dr Agustín Dalmasso, director del laboratorio de inmunología del Instituto de Investigaciones Médicas – UBA y recién regresado al país de su estadía en EE.UU., buscaba jóvenes egresados para presentarlo al CONICET. Cosa que hice: me pude recibir e ingresé al CONICET en 1968, por mis antecedentes (publicaciones en esas épocas del becario de iniciación ¡!), más la autoridad de Dalmasso reconocido y apoyado por el Dr Houssay (a quien conocí pero no recuerdo haber visto su Nuca, salvo por la lectura del hermoso libro de “Pirincho” Cereijido, perdón el Dr Marcelino Cereijido) y por el valor del I.I. Médicas. Mi tema de investigación fue el “Metabolismo de componentes del Complemento”. Aislábamos el C3, trabajo que nos llevaba unos 20 días para obtener una proteína impura pero activa que cuando era marcada con Iodo 125 perdía lo poco que tenía y volver a empezar. La ingeniería genética no solo no existía sino que nadie se la imaginaba.

En los tiempos “libres” además de hacer cursos, estudiar etc, con Agustín (en aquellas épocas el Dr. Dalmasso, gran persona, extraordinario investigador y con capacidades especiales para la formación de investigadores) (20) trabajamos sobre la membrana de glóbulo rojo, su estructura, sus componentes, dado que era el modelo sobre el que se analizaba la actividad del Complemento. Acá si avanzamos mucho, presentamos trabajos a congresos, publicamos en revistas, en los “clubes” de la membrana donde dos jóvenes investigadores, P. Garrahan y A. Rega eran los que más sobresalían y entusiastas organizadores con Dalmasso y otros científicos. El de la estructura de la membrana de glóbulo rojo pasó a ser mi primer tema de tesis abandonado. Pero eran épocas complicadas en el país (años 1968 al 70) sobre todo para un joven investigador full time como Dalmasso formado en EE.UU y su regreso al Norte fue inevitable.

No voy a seguir en detalle mi historia, sólo agregar brevemente que luego seguí trabajando con el Dr Jorge Manni, también recién regresado de su estadía en La Jolla, excelente amigo, investigador y médico. Pero me comenzó a interesar, como a varios de los jóvenes becarios o egresados de fines de los '60, la biología molecular y luego de haber realizado el primer curso de esta especialidad que se hizo en el Instituto de investigaciones Bioquímicas con la dirección del Dr Isarel Algranatti en el año que el Dr Federico Leloir obtuvo su Premio Nobel (1970). Esto me llevó a pasar al laboratorio de Sustancia Vasoactivas que dirigían los Drs Nahmod y Finkielman (“los invasores” del I.I.M., habían publicado en Nature en 1964 que habían encontrado actividad símil Angiotensina, en el cerebro de animales ¡!!) donde se acababan de integrar dos doctores especializados en biología molecular: D. Goldstein y K. Fisher Ferraro. Continué allí mi beca de CONICET siendo mi director el Dr Alejandro Paladini: uno de los principales científicos del país que falleció hace menos de un año y que reunía, además, una gran capacidad docente. Tal vez el IQUIFIB (Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas) fue el primero o uno de los primeros en realizar una exitosa transferencia de

tecnología al elaborar la Hormona de Crecimiento Humana que entregaban al Hospital de Niños de Buenos para el tratamiento de los pacientes: investigación de vanguardia, científicos de alta formación tecnología y productos para la sociedad. Un modelo a imitar. (ver página 10 de esta exposición por lo realizado con la H.C.H.).

Este breve resumen es para llegar a contar, también de manera resumida, el gran centro de investigación “básica” y clínica, alta actividad docente, dentro del hospital universitario (su principal actividad) que era el Instituto de Investigaciones Médicas que dirigía su creador, el Dr Alfredo Lanari. Existía una intensa relación entre los laboratorios de análisis y de investigación con la clínica, se cumplía aquello que luego fue (sigue siendo) lema para la hoy llamada medicina traslacional: “de la mesada al paciente”. Esta combinación de gente talentosa y dispuesta a crear e innovar entre médicos, bioquímicos, farmacéuticos, químicos, permitía pensar en llevar esas técnicas de laboratorio a usos fuera del IIM. Así fue que dos médicos con el apoyo de investigadores del Instituto, sobre todo en el caso de la inmunoquímica del Dr Dalmasso y algunos de su equipo, comenzaron a desarrollar lo que hoy llamaríamos un spin off y start up. Claro que si los jefes y directores y el CONICET se enteraban de estas cosas habríamos sido sacrificados en el patio del IIM como Giordano Bruno. Lo cierto que esta “aventura tecnológica pudo ser llevada adelante por la existencia de ese “cluster” de conocimientos, desarrollos, resolución de problemas, investigaciones aplicadas a la clínica, motivación, discusiones constantes. Este audaz comienzo llevó a generar la , tal vez, primera empresa de biotecnología, Inmunoquemia SA (21).

Para sumar a este “cluster”, en los '70 en el IIM se llevó adelante la experiencia pedagógica “la Escuelita”, es decir, una (escuela) Facultad de Medicina dependiente de la de la UBA. Donde los grupos de ingresantes fueron 20 / 30 estudiantes, cursaban todas la materias y “vivían” dentro del Instituto.

Finalizando brevemente mi camino en y hacia la biotecnología, Inmunoquemia fue muy exitosa, no sólo en lo económico: sino creando productos, montando tecnologías de producción, nuevas formas farmacéuticas, otras nuevas empresas (Sintorex: síntesis química), colaboración en investigaciones experimentales y clínicas, asistencia a congresos. Así fue como se comenzó a realizar una colaboración y transferencia de conocimientos y tecnología del Instituto Angel Roffo de la UBA hacia Inmunoquemia para la producción de Interferón Leucocitario. El laboratorio dirigido por la Dra Eugenia Sacerdote Lustig era quien tenía todos los conocimientos para ello. Al regreso de mi estadía con la beca externa de CONICET en la Faculté de Sciences de Paris – Orsay, me re-incorporé en Inmunoquemia dirigiendo la producción y desarrollo de reactivos diagnósticos, sobre todo inmunoquímicos. De allí a amar y cuidar a los conejos inmunizados que teníamos en la terraza del laboratorio y, cuando dimos un salto de producción (tecnológico??), comenzamos a inmunizar cabras en una casa – campito que se alquiló en el Gran Buenos Aires. Conseguir las cabras, inmunizarlas y sacar sangre para los no veterinarios, era una aventura digna de una novela. Mucho más novelesco fue cuando nos robaron una cabra que tenía muy altos títulos de anticuerpos contra la IgG humana: suponemos que en un asado se quemaron varios miles de dólares (pero esto lo cuento en un texto en elaboración)

Cómo sucede con la vida y más en las empresas, hubo diferencias entre los socios y salí de IQ a fines de los 70 y a comienzo de los '80 llevé a Sidus el proyecto de establecer un área de producción biológica. El aventurado (inconsciente? O empresario pionero...) Marcelo Argüelles fue quien tomó el proyecto y a nivel de la empresa y lo fuimos llevando adelante, pero ya aparecía la ingeniería genética en las revistas científicas abundantemente y las primeras empresas “biotech” se asomaban en USA. Así fue que además de hacer IFN de leucocitos pensamos un proyecto de futuro , creando un laboratorio de biología molecular para que comenzara a hacer investigaciones dirigidas a poder clonar el gen (genes de IFN) y para otras proteínas. El estudio que ha realizado Aguiar (21) lo cuenta de manera precisa. Más adelante voy a complementar la versión personal de esos años y su impacto hacia el futuro. (texto en preparación). El laboratorio de desarrollo y producción de biológicos lo denominamos Área de biotecnología del Instituto Sidus, nos daba cierta “vergüenza” de decir directamente biotecnología, pero sí tenía muy en cuenta el concepto de “fábricas de tecnología” del Profesor Jorge Sábato a quien pude conocer, tratar y aprender sobre la vida y la tecnología en

sus tres últimos años de vida. Pero 3 ó 4 años más a tarde por nuestro crecimiento, más la llegada de la Democracia a nuestro país, regreso de científicos etc, creamos BioSidus SA, sobre todo por la necesidad de tener una gestión, gerenciamiento, diferente que necesita una empresa innovadora de biotecnología respecto de la grande farmacéutica y porque esa relación de las dos empresas debía ser fortalecida respetando las dos culturas. Ya en esos años utilizábamos todas las medidas de calidad y regulación que, no solo exigían nuestras autoridades, sino que veíamos que se hacía en el FDA y en el NIH.

A fines de los 80, 1989, comenzamos a trabajar en lo que hoy es la actual planta de BioSidus en CABA, ya con equipamientos, procesos, personal, zonas de seguridad, regulaciones, necesarias para elaborar las materias primas de los biofarmacéuticos.

Luego me reintegré a la “actividad académica” en la UBA primero y luego en la U.N. de Quilmes como profesor, investigador, director de la Carrera de biotecnología pero sobre todo en el área de transferencia de tecnología y creación de nuevas empresas a partir de jóvenes egresados e investigadores.

Hoy continúo algunos trabajos en la UNQ pero llevamos adelante el funcionamiento de la Planta de Biotecnología Industrial de INTI para microorganismos y en construcción una de unos 500 metros cuadrados para células animales.

En síntesis, desde los conejos y las aventuras “casi estudiantiles” (ó, “.....juveniles las falta de consejos...”) de los primeros tiempos de los '70 hasta la actualidad de producción de biofarmacéuticos en gran escala y con las normas GMP y las leyes de propiedad intelectual, marcan un proceso de toda nuestra industria, su modernización y actualización.

7. - CONCLUSIONES.

Las mayores diferencias en la producción de biofármacos entre la década de los '80 y comienzos de la década de los '90, en Argentina, como acabo de señalar más arriba, son las necesarias y estrictas normas regulatorias (resumidas por sus siglas en inglés:GMP,GLP, etc); ley de patentes y en general cumpliry desarrollar todo lo relacionado con la Propiedad Intelectual; grandes volúmenes de producción sobre todo para Ac Mc y las necesarias y relacionadas plantas de producción.

No obstante, el futuro parecería ir a hacia una medicina más personalizada, con lotes de producción más chicos según perfiles de los pacientes y eso hace que se deba volver a adecuar la producción. En los últimos años ha aumentado la aprobación de productos para las llamadas enfermedades raras en EE.UU. y en Europa.

Por otro lado hoy contamos en nuestro país con una Biotecnología en Sector Salud con las siguientes características:

- Un sector industrial farmacéutico nacional consolidado.
- Producen; desarrollan; comercializan; exportan.
- En general tienen buenas relaciones con centros académicos.
- Existencia de recursos humanos de calidad en toda la cadena de producción
- Hace falta fortalecer la formación de Ingenieros y Biólogos en Bioprocesos.
- Existencia de , por lo menos, tres grupos biofarmacéuticos consolidados: BioSidus; Gema Biotech y Grupo Chemo / Elea / PharmADN
- Sector de empresas “biotech”: todavía pequeño, pero en crecimiento.
- Políticas oficiales: especialmente MINCYT; pero también de los Ministerios de Industria y Salud.

Sin embargo no todo es “alta tecnología”. Tener personal formado significa que sepan pensar y actuar según su realidad. En este sentido me interesa finalizar comentando una investigación (un “paper”) de la Dra K. Broberg (22).

Este grupo multidisciplinario de investigadores de Suecia, EE.UU. y Perú, dirigidos por la Dra K. Broberg, demuestran que hay genes que protegen a la población andina contra el Arsénico (As). Es conocido que el As en el agua de bebida causa severos efectos en la salud humana y esto es una preocupación en los países en vía de desarrollo, inclusive en varias provincias de Argentina.

Las poblaciones indígenas de la región de los Andes de Sud América han bebido agua con altos contenidos de As durante miles de años. Los habitantes de San Antonio de Los Cobres (S.A.C.) en nuestro país tienen un haplotipo del gen AS3MT (quemetaboliza mayormente el As), que les permite reducir los efectos tóxicos del As debido a la rápida excreción del mismo. En la publicación demuestran que la adaptación a los altos niveles de As en el agua que consumen fue una selección positiva del gen protector AS3MT.

Se estudiaron 323 habitantes de esa ciudad, el 68,7 % portan la variante genética que les da protección, en esta población que está expuesta desde hace 11 mil años al As, con niveles de 200 ug/L mientras que el límite para consumo humano recomendado por la OMS es de 10 ug/ L (20 veces menos ¡!!!!). Se calcula que en América latina hay 4 millones de personas que beben agua con As muy por encima de los niveles superiores aceptados.

SEGÚN LOS AUTORES LA SELECCIÓN GENÉTICA DETECTADA EXPLICARÍA LA MAYOR MORBILIDAD Y MORTALIDAD DE NIÑOS Y ADULTOS QUE NO PORTABAN ESA VARIANTE GENÉTICA.

Un urólogo de la Universidad de Los Andes, Chile, sostiene que este hallazgo podría ayudar a “intentar diagnóstico precoz de enfermedades inducidas por intoxicación con As en población sin factor protector”.

Pero la directora sueca, Broberg, enfatiza que “... aunque la mayoría de las personas de S.A.C. tenga un metabolismo del As rápido y eficiente, NO SIGNIFICA QUE ESTÉN TOTALMENTE PROTEGIDOS DE SU TOXICIDAD. POR ESO SUS NIVELES DEBERÍAN BAJARSE EN EL AGUA POTABLE “. No sólo en esa ciudad sino en todas las poblaciones: es más sencillo, más económico y más fácil de llegar a todos los pobladores, haciendo tratamientos al agua que pensar en sofisticadas soluciones de nuevas tecnologías. Estas últimas hay que conocerlas, dominarlas y usarlas cuando corresponda y de acuerdo a necesidades locales.

De alguna manera lo ejemplifica más concretamente uno de nuestros principales analistas sociales, desgraciadamente fallecido hace unos pocos años, Roberto Fontanarrosa. Reemplazo su calidad plástica por el diálogo de las dos personas de su dibujo:

Persona mayor (femenina): “A las siete van a pasar un programa sobre la longevidad. Parece que en el 2000, el hombre puede llegar a vivir unos 150 años”.

Persona mayor (masculina): “Y qué hacemos hasta las siete?”.

BIBLIOGRAFIA

- 1 – a) L. Moledo – Historia de las ideas científicas. De Tales de Mileto a la máquina de Dios – Número 18 – Página 12 – Buenos Aires – Argentina – 2013; b) Bruce Alberts: Why national Science Academies? Science 1 March 2013: Vol. 339 no. 6123 p. 1011
- 2 – G Walsh. BioPharm Intern. Vol 25, issue 8, p 34 – 36; 2010
- 3 – J. Goldstein- Ann. N.Y. Acad. Sc. 1999, June, pag. 8 – 21. “Burgers, chips and genes”.
- 4 – a) André Maurois. « La vie de Sir Alexander Fleming ». Edit. Hachette. 1959 ; b) Chaim y Florey : internet, consultado marzo 2013. http://www.ox.ac.uk/research/medical_sciences/projects/penicillin.html
- 5–Ronald Rader : “FDA Biopharmaceutical Product Approval and Trends : 2011” (www.biopharma.com/approvals_2011.html). Consultado Enero 2013.
- 6 – D.Roth and P. Cuatrecasas: “The distributed partnering models for Drug Discovery and Development”. January 2010. Kauffman, The Foundation of Entrepreneurship (www.kauffman.org).

- 7 – Arthur Kornberg “La Hélice de oro. Aventuras biotecnológicas: el recorrido de la ciencia a los negocios” . — Ed. UNQ – 2001.
- 8 – “Report to the president on ensuring American Leadership in Advanced Manufacturing”- Executive office of the President – President’s Council of Advisors on Science and Technology – June 2011.
- 9 – Gary Pisano: “Restoring American Competitiveness”. Harvard Business Review – Julio – Agosto, 2009; pag. 1 – 14.
- 10 – S. Berger – “Why Manufacturing Matters”. TechReview, julio 1, 2011.
- 11 – Michael Dertouzos, Robert Solow and Richard Lester “Made in America. Regaining the Productive Edge”. The MIT Press. 1989.
- 12 – E.B. Reynolds: “Institutions, Public Policy and the Product Life Cycle: The Globalization of Biomanufacturing and Implications for Massachusetts” MIT-IPC-10-001. February 2010.
web.mit.edu/ipc/www.
- 13 – “De la Biotecnología a la BioIndustria”. A.Díaz. Revista Informe Industrial. Noviembre 2009. Argentina
- 14 - a) “Biotecnología y Desarrollo: un modelo para armar en Argentina”. Bisang, Diaz, Gutman et al. Editorial Prometeo Bs As Diciembre 2006.
b) “Las empresas de Biotecnología en Argentina”. R.Bisang y L. Stubrin. CEPAL – Diciembre 2010.
- c) G. Gutman y P. Lavarello: “Desarrollo reciente de la Moderna Biotecnología en el sector Salud Humana”. Documento de Trabajo CEUR – CONICET – 3/2010 Septiembre.
- 15 – Codner, D; Becerra, P y Díaz, A.(2012) “Blind technological transfer or technological leakage: a case study from the South”. Jour. Of Technology Management and Innovation – Vol. 7, N° 2; pages: 184 – 194. ISSN 0718 – 2724.
- 16 – “Auge, involución y resurgimiento de la industria farmoquímica Argentina”. H. Sigman. En “la química en la Argentina” publicado por la Asociación Química Argentina. 2011. Páginas 285 – 290.
- 17 – “Las Abuelas y la Genética. El aporte de la ciencia en la búsqueda de los chicos desaparecidos”. Abuelas de Plaza de Mayo. 2008.
- 18 – “Top ten biotechnologies for improving health in developing countries”. Abdallah S. Daar et al. Nature Genetics, vol. 32, pag. 229 – 232 (2002)
- 19 - Agustín Lage. “Connecting immunology research to public health: Cuban biotechnology”. Nature immunology, vol.9; N° 2, February 2008; 109 112.
- 20 - Dalmasso AP. On the intersections of basic and applied research in xenotransplantation. Xenotransplantation 2012; 19: 137–143. _ 2012 John Wiley & Sons A/S.
- 21 – “Empresa científica y empresa de científicos: la producción comercial de interferón Entre la firma Inmunoquemia y el Instituto de Oncología “Angel H. Roffo” (1975 -1980). Diego Aguiar y José D. Buschini- Revista Redes, vol.15, N° 30, Diciembre 2009, pag. 41 – 68.
- 22 - - “Possible positive selection for an Arsenic – Protective Haplotype in Humans” C.M. Schlebusch et al, Karin Broberg – Environmental Health Perspectives – Vol. 121. – N° 1 – January 2013 – pag. 53 – 58.

PREMIO MARENZI – 2013

INFLUENCIA DEL ENTORNO LIPÍDICO SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS INTEGRALES DE MEMBRANA. LA BOMBA DE CALCIO COMO MODELO

María Florencia Pignataro, Martín M. DodesTraian, F. Luís González Flecha e Irene Mangialavori

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini"-Departamento de Química Biológica-Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

PROTEÍNAS DE MEMBRANA: LA BOMBA DE Ca^{2+} DE MEMBRANA PLASMÁTICA COMO MODELO

1.1. La organización de proteínas en la membrana

De acuerdo al modelo postulado por Popot y Engelman. (1990) 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. 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 Sarcoplasmático (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 Donnet., 2001).

1.3. La Bomba de Calcio de Membrana Plasmática (PMCA)

1.3.1. 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 (*aah*) 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 isoformahPMCA1b (Strehler y col., 1990). En ningún caso la abundancia de la enzima excede el 0.1% del total de las proteínas de membrana.

1.3.2. El ciclo catalítico

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 .

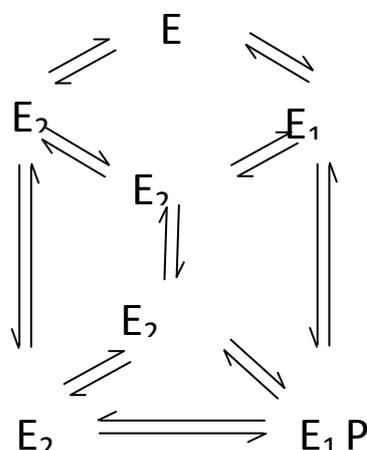


Figura 1.3.1: Ciclo de reacción para la hidrólisis de ATP catalizada por la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática. E_1 y E_2 son las dos conformaciones extremas clasificadas por su afinidad al calcio.

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.

1.3.3. Activadores

1.3.3.1. Calmodulina

El modulador más importante de la actividad de la bomba de calcio es la calmodulina (CaM), una proteína de 16500 Da, con alto contenido de aminoácidos ácidos y que se encuentra en el orden de 2-3 μM en el citoplasma. La calmodulina interactúa con el extremo C-terminal de la bomba de calcio y se postula que su mecanismo de acción consiste en 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. 1.3.3.1).

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).

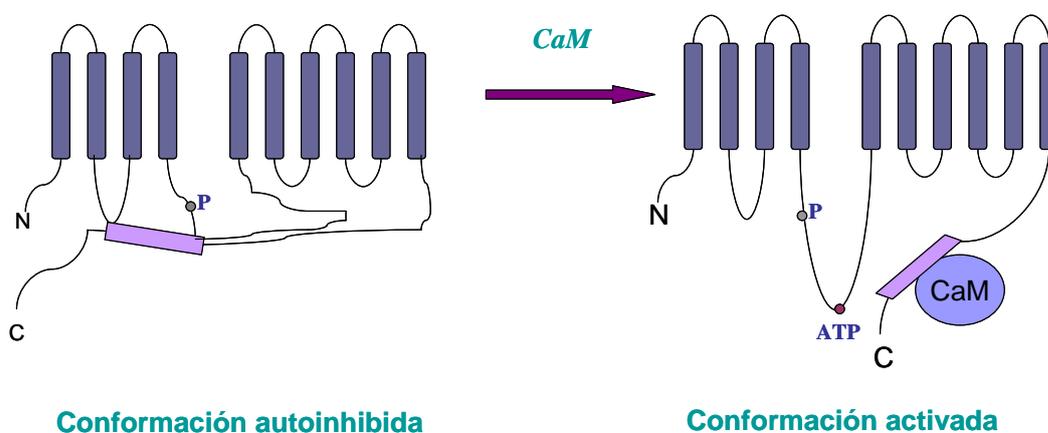


Figura 1.3.3.1: Esquema de la activación de la PMCA por calmodulina. Se muestran la conformación autoinhibida (*Izq.*) y la activada (*Der.*). El rectángulo lila representa el sitio de unión de CaM en el dominio C-terminal de la bomba (Adaptado de Strehler, 2001).

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

1.3.3.2. Fosfolípidos ácidos

Los fosfolípidos ácidos, como el ácido fosfatídico, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, aumentan la afinidad aparente de la enzima por el calcio (Enyedi y col., 1987). Pero, a diferencia del mecanismo de acción de la calmodulina, estos compuestos aceleran la desfosforilación de la enzima (Filomatori y Rega, 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 Adamo, 2002).

1.3.3.3. Ácidos grasos insaturados

Los ácidos grasos insaturados, como el oleico, linoleico o araquidónico, causan la activación de la PMCA (Niggli y col., 1981). A diferencia de los fosfolípidos ácidos, la activación se produce a concentraciones mucho menores –micromolares- que, al ser superadas rápidamente causan la inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa. Si bien el mecanismo de acción de este modulador aún no ha sido completamente entendido, se ha descrito que provoca un aumento de la afinidad aparente por el calcio, y que este efecto sería independiente de la presencia de calmodulina o fosfolípidos ácidos (Oliveira y col., 2008).

1.3.3.4. Otros activadores

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

1.4. Estructura de la Bomba de Calcio de Membrana Plasmática

1.4.1. Estructura primaria de la isoforma hPMCA4b.

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.

1.4.2. Dominios estructurales

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.

1.4.3 Dominios funcionales

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., 1992). La delección de la primera es esencial para la modulación por fosfolípidos ácidos (de Tezanos Pinto y Adamo, 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; Rinaldiy Adamo., 2009).

CAPÍTULO 2

SISTEMAS DE RECONSTITUCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA: MICELAS MIXTAS

2.1. Formación de micelas

2.1.1. Especies anfifílicas

Se denominan anfífilos a los compuestos cuya estructura molecular incluye una parte hidrofóbica y otra hidrofílica (Moroi, 1992). El grupo polar del anfifilo es generalmente llamado cabeza mientras que el grupo no polar, cola.

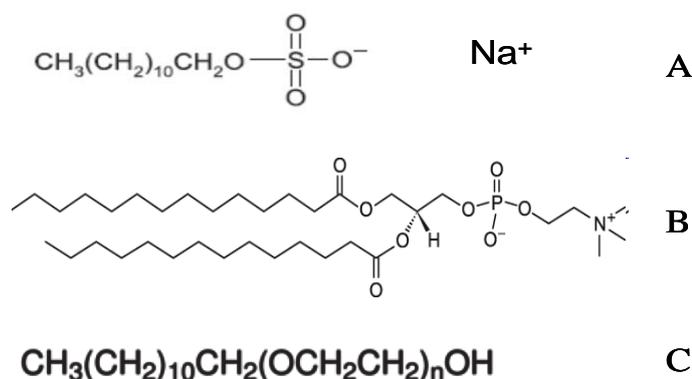


Figura 2.1.1: Se representan las estructuras de A) el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), B) un miembro de la familia de las fosfatidilcolinas C) un detergente de la familia de los polioxietilenglicoles C_{12}E_n (en la mencionada nomenclatura, E y C representan los grupos etilenglicol y metileno, respectivamente).

A bajas concentraciones, los anfifilos son muy poco solubles en agua ya que la interacción entre la cola no polar y el solvente es desfavorable. La pequeña solubilidad es consecuencia del ordenamiento de las moléculas de agua alrededor de las colas no polares, con lo cual se maximiza la formación de enlaces puente de hidrógeno entre las moléculas del solvente (Creighton, 1993).

Al aumentar la concentración, se observa un equilibrio entre las moléculas del anfifilomonoméricas y agregados de anfifilos denominados micelas, en los cuales las colas hidrofóbicas están en contacto entre sí y las cabezas polares se exponen al solvente.

2.1.2. Formas y tamaños de las micelas

En la formación de las micelas intervienen dos tipos de fuerzas opuestas. La primera surge del efecto hidrofóbico y redundante en la interacción entre las colas de los anfifilos. La segunda es el resultado de la repulsión entre las cabezas polares de igual carga de los anfifilos. El tamaño y la forma de las micelas están determinados por el balance entre ambas fuerzas (Tanford, 1973), que a su vez depende en forma directa de la estructura química de las moléculas de anfifilos. La geometría de las micelas está relacionada con el volumen de la parte hidrofóbica de la molécula (v), la longitud de la cadena no polar (l) y la fracción del área de la micela ocupada por cada cabeza polar (S). El volumen (V) y área (A) de la micela están relacionados con los parámetros geométricos del anfifilo mediante:

$$A = NA \cdot S$$

$$V = NA \cdot v$$

donde NA , denominado número de agregación, es el número promedio de moléculas de anfifilo que integran una micela. Las cadenas no polares de los anfifilos se disponen de manera de evitar la formación de cavidades dentro de la micela lo que implica que la forma geométrica que adopte la micela estará además condicionada por la longitud de la cadena no polar. Por ejemplo para una micela esférica:

$$A = NA \cdot S = 4\pi r^2$$

$$V = NA \cdot v = \frac{4}{3} \pi r^3$$

Dividiendo V por A y considerando que el radio de la micela (r) deberá ser igual o menor al largo de la cadena hidrofóbica (l) se obtiene que:

$$v/1S \leq 1/3$$

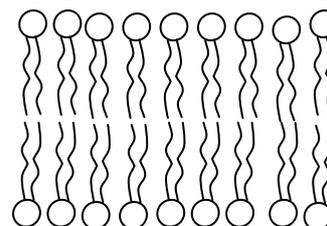
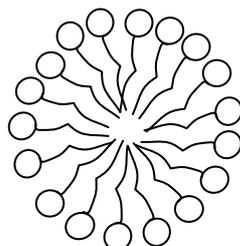
Es decir que para que un anfifilo pueda formar micelas esféricas, su forma geométrica debe ser tal que la relación $v/1S$ sea a lo sumo $1/3$. El valor máximo que puede tomar $v/1S$ para que un anfifilo pueda formar micelas de otras formas geométricas puede calcularse de manera similar (Gennis, 1989). De esta manera, anfifilos cuyo $v/1S \leq 1/3$ forman micelas esféricas mientras que fosfolípidos cuyo $v/1S$ está en el rango de $1/2 - 1$ forman bicapas.

Si bien, como se muestra en la figura 2.1.2, la forma geométrica del anfifilo determina que este tienda a formar micelas esféricas, ésta esfericidad se ve limitada por la cantidad de monómeros que puede incorporar la micela. Se puede calcular que para un anfifilo cuya cadena hidrofóbica posee 14 átomos de carbono el máximo número de monómeros que admite una micela esférica es 56 (Tanford, 1973). Se requiere de una distorsión en la esfericidad de la micela para que esta pueda incorporar un número mayor de moléculas de anfifilo.

Forma geométrica del anfifilo



Forma geométrica de la micela



Ejemplo

Lisofosfatidilcolina

Fosfatidilcolina

Figura 2.1.2: Modelo geométrico de micelas y bicapas.

La alternativa más simple en este caso es que las micelas adopten una forma de elipsoide de revolución en el que sólo uno de los semiejes está limitado por la longitud de la cadena hidrofóbica de los anfifilos individuales. Es posible incorporar hasta 220 moléculas de un anfifilo cuya cadena hidrofóbica posee 14 átomos de carbono si la micela adopta una forma de oblato con una relación entre los semiejes del elipsoide $a_0/b_0 = 2$.

Robinson y Tanford (1975) consideran que cuando una proteína de membrana se inserta en una micela de detergente, la forma y el número de agregación de la micela permanecen inalterados. Según estos autores, las proteínas actúan únicamente como un núcleo para la formación de las micelas. Møller y le Maire (1993) señalan que en el caso de una proteína cuya región transmembrana es de gran tamaño esta hipótesis no sería válida. En estos casos se requeriría un gran número de moléculas de anfifilo para cubrir la superficie hidrofóbica de la proteína de manera que el número de agregación de las micelas que contienen la proteína de membrana sería mayor que el de las micelas vacías. El resumen de los posibles modelos de interacción entre una proteína de membrana y el detergente que forma la micela se muestran en la Fig. 2.1.4.

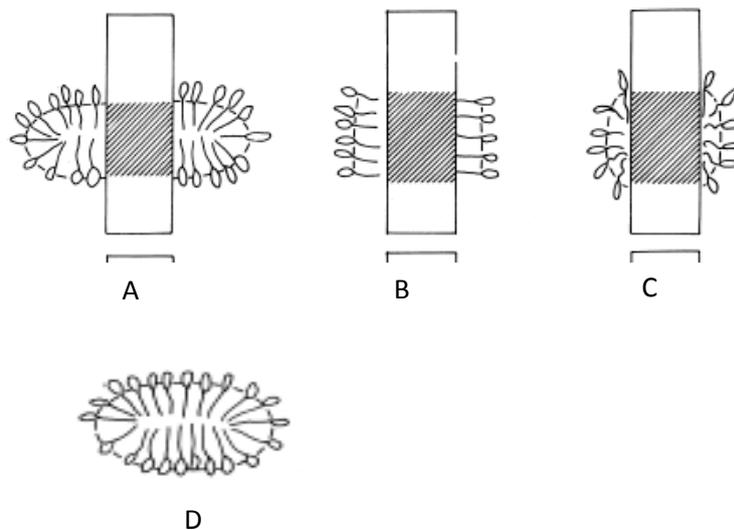


Figura 2.1.4: Modelos geométricos de micelas en las que se encuentra incorporada una proteína de membrana. En el primer modelo (A) el detergente formaría un elipsoide de tipo oblatado en el que la proteína se hallaría inserta. En el segundo modelo (B), el detergente adoptaría una disposición de monocapa dejando cadenas hidrofóbicas expuestas en los extremos. El tercer modelo (C) corresponde a un elipsoide de tipo prolata. Se muestra a efectos de comparación la estructura de una micela tipo oblatada de detergente puro (D). (Tomado de Møller y Le Marie, 1993)

La ecuación 2.1 muestra que el agregado de un segundo anfifilo produce una disminución de la concentración micelar crítica del primero.

2.2. Sistemas fosfolípido-detergente

2.2.1. Modelo de tres estados

El proceso de disolución de liposomas utilizando detergente fue exhaustivamente estudiado utilizando diversas técnicas, incluyendo turbidimetría (Levy y col., 1990), dispersión cuasielástica de luz (Almog y col., 1986), transferencia de energía (Ollivion y col., 1988), resonancia magnética nuclear (Paternostre y col., 1988), centrifugación analítica (Levy y col., 1991) y microscopía electrónica (Vinsón y col., 1989). Los resultados de estos estudios sugieren que este proceso incluiría tres estados (Lichtenberg y col., 1983; Silvius, 1992).

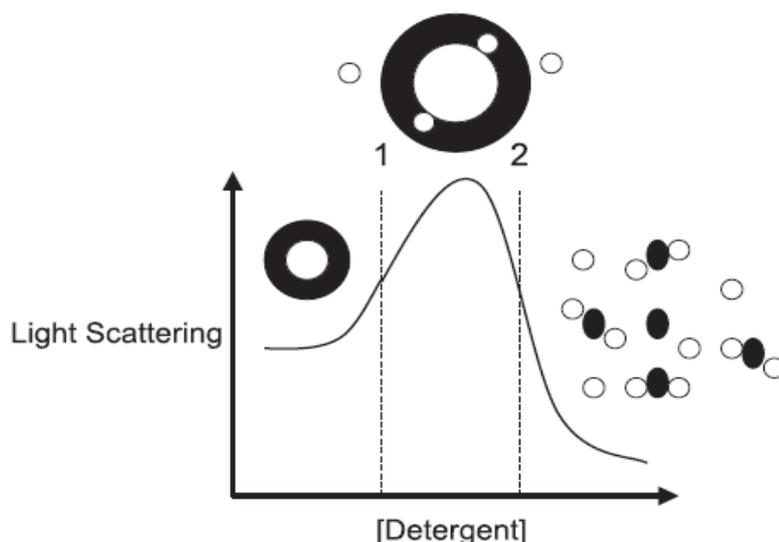


Figura 2.2.1:Diagrama esquemático que muestra la transición de fase desde liposomas a micelas causadas por la partición del detergente en bicapas. Las líneas negras gruesas representan lípidos o liposomas; los círculos blancos abiertos son moléculas de detergente. La línea llena representa el cambio en la turbidez de la muestra en los diversos estados, seguido por el fenómeno de dispersión de luz. Las líneas punteadas estiman las transiciones de fase. Tomado de Seddon y col., 2004.

Como podemos ver en el esquema de la figura 2.2.1, en una primera etapa (previa a la línea 1), el detergente comienza a particionarse en los liposomas, presentándose un cambio muy leve en la turbidez. Entre las líneas 1 y 2, la concentración del detergente se aproximaría a valores saturantes y se formarían liposomas saturados de detergente. En esta situación, ocurre la transición bicapa → micelas globulares. Luego de la línea 2, la mayoría de los liposomas están disueltos en micelas mixtas, alcanzando eventualmente, la solubilización total.

2.3. Sistemas fosfolípido-detergente-proteína

Los estudios estructurales y funcionales de proteínas de membrana en el entorno nativo se ven restringidos dada la complejidad de dichos sistemas (Rigaud y col., 1995). Por este motivo, muchas veces es necesario extraer la proteína de la membrana y reconstituirla en un sistema artificial.

Los sistemas más frecuentemente utilizados para la reconstitución son las bicapas artificiales y las micelas compuestas por detergente o por fosfolípidos y detergente. Se considera que el sistema micelar es adecuado si las proteínas de membrana conservan sus propiedades funcionales (le Maire y col., 1983).

Robinson y Tanford (1975) estudiaron el modo de interacción de proteínas de membrana con micelas de detergente. Estos autores consideran que la región transmembránica de las proteínas actúa únicamente como un núcleo para la formación de las micelas, sin alterar el número de agregación de las mismas.

Moller y le Maire (1993) señalan que esta hipótesis no sería válida para proteínas cuyas regiones transmembránicas poseen un gran tamaño. En este caso, se requeriría un gran número de anfífilos para cubrir la superficie hidrofóbica de las regiones transmembránicas. Como consecuencia,

el número de agregación de las micelas en las cuales se encuentra incluida la proteína sería mayor que el de aquellas carentes de proteína.

Las interacciones entre los anfífilos y la proteína cuando ésta es solubilizada en micelas, fueron estudiadas por Volwerk y col. (1987) utilizando sondas de ESR (Resonancia de espín electrónico). Estos autores, observaron la aparición de una población de anfífilos con movilidad restringida cuando se incorpora la proteína citocromo c oxidasa en micelas de fosfolípido y detergente. Estos anfífilos integrarían una monocapa rodeando la superficie hidrofóbica del dominio transmembránico de la proteína y se encontrarían en un equilibrio dinámico de intercambio con aquellos que se encuentran en el seno de la micela. La composición de la monocapa estaría determinada por la composición de las micelas y la afinidad de fosfolípidos y detergente por la superficie de la región transmembránica de la proteína.

2.4.El entorno lipídico y su influencia en las proteínas de membrana

Las proteínas integrales de membrana funcionan en un ambiente formado, en parte, por la bicapa lipídica circundante. La composición de dicha bicapa debe proporcionar un entorno adecuado para un funcionamiento óptimo de las proteínas en la membrana.

El efecto de la estructura de los lípidos sobre la función de las proteínas de membrana puede ser descrito en términos moleculares, es decir, en términos de interacciones moleculares entre el lípido y la proteína como a través del efecto hidrofóbico, puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas. También podría ser descrito en términos físicos, es decir, en términos de las propiedades físicas de la bicapa lipídica, como la fluidez, la tensión de la membrana y propiedades relacionadas.

Un ejemplo donde el efecto de la estructura de los lípidos sobre la funcionalidad de la proteína de membrana se puede explicar en términos moleculares, es el estudio del efecto de la estructura lipídica en la unión de las anexinas a la superficie de una bicapa lipídica. Se halló que la unión involucra Ca^{2+} , que actuaría como puente entre la anexina y las cabezas polares de los fosfolípidos (Swairjo y col., 1995). Estos investigadores, obtuvieron la estructura cristalográfica de la anexina V, en presencia de glicerofosfoserina (GPS) y glicerofosfoetanolamina (GPE). Mediante el análisis de las interacciones moleculares presentes entre las cabezas polares de los lípidos y determinados residuos aminoácidos, pudieron evidenciar que existían interacciones más extensivas (en el cristal) con GPS comparadas con respecto a GPE, lo cual sugeriría que existe una unión más fuerte con fosfatidilserina que con fosfatidiletanolamina. Y de hecho, había sido previamente demostrado por Andree HA y col.(1990) y Blackwood y col.(1990) que si bien, la anexina V se une a bicapas con fosfatidiletanolamina, se une mucho más fuertemente a bicapas que contengan fosfolípidos aniónicos (ácido fosfatídico, fosfatidilserina y fosfatidilinositol), (Raynal y Pollard, 1994)). Sin embargo, centrándonos en el ejemplo de la anexina, sabemos que la inserción de la misma en la sección de las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana debería ser afectada por propiedades físicas de la región de las cabezas polares, como la presión lateral (Lee, 2004), pero por lo explicitado anteriormente, esta razón no sería suficiente para explicar la compleja interacción de la anexina con los fosfolípidos del entorno. Sin embargo, existen otras proteínas que se unen a la región de las cabezas polares de los fosfolípidos sin sitios de unión específicos en la misma, como la CTP: fosfocolinacitidiltransferasa, para este tipo de interacciones la explicación física sería más adecuada (Lee, 2004).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Sabemos, por análisis de secuencias genómicas, que el 30% de las proteínas producidas por el *Homo sapiens* son de proteínas integrales de membrana (Wallin y von Heijne, 1998). Sin embargo, existen muy pocas estructuras tridimensionales que correspondan a proteínas de este tipo. Podríamos citar algunas razones por las que se dificulta su estudio:

- Son de difícil obtención dada su baja concentración en las membranas biológicas y además, como generalmente presentan modificaciones post traduccionales, resulta complejo sobreexpresarlas en bacterias.
- Las múltiples técnicas disponibles hasta la fecha para el estudio de proteínas, su estructura e interacciones (RMN, Cristalografía de Rayos X, Dicroísmo circular, etc.) son preferentemente útiles para proteínas de tipo soluble. Se utilizaron en proteínas de membrana, pero el proceso se torna particularmente complejo.
- Al no ser solubles en un medio acuoso, se necesita reconstituir a este tipo de proteínas en entornos hidrofóbicos, que diferirán según la proteína en cuestión.

Resulta indispensable para cualquier estudio que se desee encarar con una proteína integral de membrana, el manejo de este último ítem. El entorno lipídico de una proteína de membrana influye directamente sobre la estructura y función de la misma (Lee, 2011), es por esto que la elección de un sistema adecuado de reconstitución y las razones para dicha elección, no serán triviales.

En nuestro laboratorio, se desarrollan estudios sobre la Bomba de Calcio de la Membrana Plasmática (PMCA); como hemos mencionado en el Capítulo 1, es una proteína integral de membrana que presenta 10 segmentos transmembrana y no se cuenta con información estructural a nivel tridimensional. Además, pocos estudios han sido llevados a cabo con el fin de dilucidar la compleja relación que guarda con los lípidos del entorno.

En el presente estudio, utilizaremos a la PMCA como modelo de proteína de membrana y su utilización nos permitirá explorar las interacciones lípido-proteína existente. Los resultados obtenidos en los distintos sistemas de reconstitución nos permitirán plantear una hipótesis que relacione el proceso biofísico que sufre el sistema y los procesos bioquímicos previamente observados.

- Las múltiples técnicas disponibles hasta la fecha para el estudio de proteínas, su estructura e interacciones (RMN, Cristalografía de Rayos X, Dicroísmo circular, etc.) son preferentemente útiles para proteínas de tipo soluble. Se utilizaron en proteínas de membrana, pero el proceso se torna particularmente complejo.
- Al no ser solubles en un medio acuoso, se necesita reconstituir a este tipo de proteínas en entornos hidrofóbicos, que diferirán según la proteína en cuestión.

Resulta indispensable para cualquier estudio que se desee encarar con una proteína integral de membrana, el manejo de este último ítem. El entorno lipídico de una proteína de membrana influye directamente sobre la estructura y función de la misma (Lee, 2011), es por esto que la elección de un sistema adecuado de reconstitución y las razones para dicha elección, no serán triviales.

En nuestro laboratorio, se desarrollan estudios sobre la Bomba de Calcio de la Membrana Plasmática (PMCA); como hemos mencionado en el Capítulo 1, es una proteína integral de membrana que presenta 10 segmentos transmembrana y no se cuenta con información estructural a nivel tridimensional. Además, pocos estudios han sido llevados a cabo con el fin de dilucidar la compleja relación que guarda con los lípidos del entorno.

En el presente estudio, utilizaremos a la PMCA como modelo de proteína de membrana y su utilización nos permitirá explorar las interacciones lípido-proteína existentes. Los resultados obtenidos en los distintos sistemas de reconstitución nos permitirán plantear una hipótesis que relacione el proceso biofísico que sufre el sistema y los procesos bioquímicos previamente observados.

Los objetivos de este trabajo son:

- 1 Determinar la dependencia de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA con la fracción molar de fosfolípido (X_{FL}) en sistemas lípido-detergente.
- 2 Determinar la dependencia de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA con la longitud y grado de saturación de la cadena carbonada de los fosfolípidos utilizados en su reconstitución.
- 3 Aplicar un modelo para explicar el comportamiento de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la X_{FL} .
- 4 Explicar los cambios evidenciados en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, mediante el estudio de algunas propiedades físicas del sistema fosfolípido-detergente
- 5 Evidenciar los posibles cambios estructurales que presente la PMCA cuando se la reconstituye en micelas mixtas de fosfolípido-detergente.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.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 MOPS-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 CaCl₂. Las membranas se congelaron a -70 °C hasta el momento de usarlas.

4.2 Obtención de PMCA purificada

La bomba de Ca²⁺ 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 Villalobo, (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 MgCl₂, 10 mM MOPS-K (pH 7.4 a 10 °C), 100 μ M CaCl₂, 2 mM DTT, 0.5 % p/v C₁₂E₁₀ 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 Ca²⁺ en esta solución permite que la bomba de Ca²⁺ 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 300 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM MOPS-K (pH 7.4 a 10 °C), 100 μ M CaCl₂, 2 mM DTT, 0.005 % p/v C₁₂E₁₀ y 20 % p/v glicerol. Para eluir la bomba de Ca²⁺ se utilizó una solución 300 mM KCl, 10 mM MOPS-K (pH 7.4 a 10 °C), 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.005 % p/v C₁₂E₁₀ y 20 % p/v glicerol. El quelante de Ca²⁺ presente en esta solución disminuye la concentración del ion en la columna de manera que el complejo calmodulina-bomba de Ca²⁺ se disocia y la proteína eluye. Las fracciones que presentaron mayor emisión de fluorescencia a 333 nm –excitadas a 280 nm– y mayor actividad Ca²⁺-ATPasa, fueron reunidas y conservadas a -180 °C hasta su utilización. La concentración de enzima purificada en la preparación obtenida fue μ g/10 (~80nM). El rendimiento aproximado de la purificación fue μ g de enzima purificada por mg de proteína presente en las membranas aisladas de glóbulos rojos.

4.3 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 horas. 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 μ g.

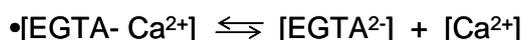
4.4 Cuantificación de fosfolípidos

Se midió la concentración de fosfolípidos de acuerdo al procedimiento descrito por Chen y col. (1956) con algunas modificaciones.

Se calentaron las muestras y los patrones a 100 °C hasta que llegaron a sequedad. Se adicionó 0.1 ml de HNO₃ y 0.9 ml de HClO₄, y se incubaron a 190°C durante 30 min. Con este procedimiento se mineralizan los componentes de la muestra y se libera el fosfato de los fosfolípidos. La masa de este compuesto en las muestras y los patrones se determinó según el método de Fiske y Subbarow (1925).

4.5 Determinación de la concentración de Ca²⁺

La concentración de Ca²⁺ libre ([Ca²⁺]_{libre}) fue determinada con el programa computacional *Max Chelator* (Bers, 1982) y controlada con un electrodo sensible a Ca²⁺. En todos los casos se utilizará buffer EGTA- Ca²⁺. La concentración de EGTA fue 1mM y la concentración de CaCl₂ fue variable dependiendo de la [Ca²⁺]_{libre} necesaria. La utilización de un buffer EGTA- Ca²⁺, y no directamente CaCl₂, permite un mayor control sobre la [Ca²⁺]_{libre}, descartando la posibilidad de que ésta se viera afectada por cualquier otro reactivo presente en las mezclas de reacción. La siguiente ecuación describe como a partir de una concentración de Ca²⁺ y EGTA dada se obtiene una concentración de Ca²⁺ libre acotada por el equilibrio entre las formas quelada y libre de este catión:



4.6 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 10-25 minutos, dependiendo del fosfolípido utilizado).

4.7 Medición de la actividad Ca²⁺-ATPasa

La actividad Ca²⁺-ATPasa de la PMCA se determinó midiendo la cantidad de fosfato (Pi) liberado por el método de Fiske y Subbarow (1925). Se incubó a la proteína a 37°C durante 40 min en el siguiente medio de reacción: 120 mM KCl, 30 mM MOPS-K (pH 7.4 a 37 °C), 3.75 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 2.1 mM CaCl₂ ([Ca²⁺]_{libre} = 100µM), 20 % (p/v) glicerol, 119 µM C₁₂E₁₀ y 2 mM ATP. La concentración de C₁₂E₁₀ es constante y se agrega una concentración adecuada de los distintos fosfolípidos ensayados, para alcanzar la fracción molar deseada. La concentración de PMCA utilizada fue de 8 nM.

4.8 Dispersión de luz (Static Light Scattering)

Las medidas de dispersión de luz se realizaron a 37°C, utilizando una cubeta de cuarzo de 3 x 3 mm, utilizando un espectrofluorómetro Jasco FP-6500 equipado con un controlador de temperatura tipo peltier Jasco ETC-237T. Se registraron las medidas a 470nm (λ_{ex.}= 470nm y λ_{em.}= 470nm) con un ancho de banda de 3nm, durante un rango de 2 min. Se promediaron los datos obtenidos cada 1 seg para cada condición ensayada. La suspensión de micelas mixtas de C₁₂E₁₀ y fosfolípidos de

diferente fracción molar de fosfolípidos (X_{FL}) fue incluida en un medio idéntico al de la medida de actividad (Sección 4.7), exceptuando la proteína.

4.9 Espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS)

Para marcar las micelas se agregó a la preparación la sonda fluorescente Rhodamina-DPPE hasta una concentración final de 10 nM. Las medidas de FCS se efectuaron en un microscopio confocal Olympus FV-1000, con un objetivo de inmersión en aceite 60X de una apertura numérica de 1.35. La muestra se excitó utilizando la línea de 559 nm de un láser de estado sólido. La potencia nominal del láser fue de 8% o 10% y se utilizó una frecuencia de muestreo de 50000 o 100000 hz, correspondientes a 40us/pixel o 20us/pixel. Las curvas de autocorrelación y su ajuste a un modelo de difusión en 3D se obtuvieron utilizando el software SimFCS (LFD, Irvine, California). A partir de los valores obtenidos de coeficiente de difusión (D), utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_{h,i} = \frac{kT}{6\pi\eta D_i}$$

Donde k, constante de los gases; T, temperatura; η , viscosidad del medio y D_i , coeficiente de difusión. Se obtuvo el radio hidrodinámico de las micelas ($R_{h,i}$).

4.10 Determinación de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en vesículas invertidas (IOVs-in-outvesicles)

El transporte de Ca^{2+} fue medido como la velocidad de incorporación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dentro de las vesículas de acuerdo al método descrito por Rossi y Schatzmann (1982) con algunas modificaciones. La preparación de PMCA se incubó a 15 °C en un medio que contenía 120 mM KCl, 30 mM MOPS-K (pH 7.4), 3 mM MgCl_2 , 2 mM de ATP. La reacción se inició con el agregado de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]\text{CaCl}_2$. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se filtraron inmediatamente a través de filtros Millipore con un poro de 0.45 nm de diámetro, el cual retiene toda la proteína (Rossi y Schatzmann, 1982). Los filtros se lavaron 3 veces con 5 ml de una solución fría de 10 mM Tris-HCl (pH 7.4, a 4 °C) y 10 mM EGTA y se dejaron secar. Luego, se transfirieron a viales con PPO/POPOP (0.4% y 0.015 % respectivamente) en tolueno. La radiactividad retenida en los filtros se midió en un contador de centelleo líquido. De igual forma, se midieron alícuotas del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ usado en el ensayo, con el objetivo de obtener la actividad específica y de esta forma transformar la radiactividad medida en nmoles de calcio. El $^{45}\text{Ca}^{2+}$ bombeado hacia el interior de las vesículas presentes en la preparación de PMCA, se calculó como la diferencia entre la radiactividad medida en presencia y ausencia de ATP.

4.11 Medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se efectuaron a 25°C en una cubeta de cuarzo de 3x3 mm utilizando un espectrofluorómetro JASCO FP-6500 equipado con un peltier ETC-237T para el control de temperatura. Los anchos de banda de emisión y excitación utilizados fueron de 3 nm. Los espectros de emisión de triptofanos de PMCA se registraron entre 305 y 400 nm excitando la muestra a 295 nm. La fluorescencia del 1-anilino-8-naftalensulfonato (ANS) fue registrada entre 400 y 600 nm tras excitar a 380 nm y entre 310 y 550 nm tras excitar a 295 nm. El control del fondo de fluorescencia del sistema micelar se realizó obteniendo espectros de los buffers con detergente 1200 nM $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y con el agregado del fosfolípido DPPC de modo de obtener una fracción molar de 0.3 (1700 mM concentración total de DPPC+ $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$). Esta concentración de micelas se ajustó para asegurar la completa partición del ANS en las micelas.

4.12 Tratamiento de datos

Las medidas de actividad se realizaron por duplicado o triplicado. Las ecuaciones se ajustaron usando un procedimiento de regresión no lineal basado en el algoritmo de Gauss-Newton. La variable dependiente fue considerada homocedástica y la variable independiente con error despreciable.

4.13 Origen y calidad de las drogas utilizadas

La sangre recientemente extraída fue cedida por la Fundación Fundosol (Argentina). La sonda fluorescente ácido 1-anilinoftaleno-8-sulfónico (ANS) proviene de Molecular Probes (Eugene, OR). Todos los fosfolípidos provienen de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Poli(oxietileno) 10-lauril éter (C₁₂E₁₀) fue obtenido de Sigma Chemical (St. Louis, MO). Todas estas drogas fueron de grado pro-análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 5

MODELO DE ACTIVACIÓN DE PMCA POR FOSFOLÍPIDOS

5.1 Introducción

En los capítulos siguientes, mostraremos como el agregado de fosfolípidos a PMCA solubilizada en detergente produce un incremento significativo de su actividad ATPasa. En este contexto, utilizamos un modelo sencillo (DodesTraian y col., 2012) para describir la regulación de la actividad.

5.2 La activación por fosfolípidos de PMCA puede ser descripta con un modelo logístico

Las interacciones entre fosfolípidos y proteínas de membrana han sido descriptas por varios modelos, pero fundamentalmente nos basamos en una extensión de un modelo de 2 pasos que relaciona magnitudes observables con la intensidad de la interacción de los fosfolípidos con el segmento transmembrana de la PMCA (Levy y col., 2003, DodesTraian y col., 2012). Este modelo se basa en definir θ_{FL} como la fracción de la superficie transmembrana de la proteína recubierta por fosfolípidos.

$$\theta_{FL} = \frac{\text{número de sitios de contacto ocupados por un fosfolípido}}{\text{número de sitios de contacto totales}} \quad (1)$$

Se asume un modelo simple de adsorción de Langmuir y se puede demostrar que θ_{FL} está relacionado con la fracción molar de fosfolípidos en las micelas.

$$\theta_{FL} = \frac{K_{ex,FL} \cdot X_{FL,mic}}{K_{ex,FL} \cdot X_{FL,mic} + (1 - X_{FL,mic})^\beta} \quad (2)$$

En este caso β es un coeficiente estequiométrico para el intercambio fosfolípidos detergente que en nuestros ensayos tomó un valor de 2 (o sea, 2 moléculas de detergente pueden ocupar el lugar de una molécula de fosfolípidos en la región transmembrana) y la constante de intercambio $K_{ex,FL}$ resulta de la combinación de las tasas de adsorción y desorción de los fosfolípidos y el detergente. La deducción de este modelo puede profundizarse para hallar una expresión general de la actividad observada en función de los valores hallados para la constante $K_{ex,FL}$ y la fracción molar de fosfolípidos en la que se haya reconstituida la PMCA (DodesTraian y col., 2012). Sin embargo, la medición de estas constantes de intercambio no es trivial en absoluto, y suele ser más práctico trabajar con una expresión que describa la activación de PMCA en función de la fracción molar de fosfolípidos (X_{FL}) y provea parámetros descriptivos en términos de actividades mínima y máxima, valores de fracción molar de media activación máxima y una idea de la cooperatividad del proceso de activación. Ese modelo mínimo es el siguiente (DodesTraian y col., 2012):

$$A = \frac{A_1 - A_0}{1 + e^{-c_x(X - X_{0.5})}} + A_0 \quad (3)$$

Este modelo relaciona la actividad ATPasa observada (A) a partir de 4 parámetros y la fracción molar de la preparación micelar. Basado en una regresión logística da como resultado una curva sigmoidea cuyos parámetros son:

A_0 : esta relacionado con la actividad a fracción molar 0. Es la asíntota inferior de la curva sigmoidea.

A_1 : representa la actividad máxima de la ATPasa para un determinado fosfolípido o mezcla de fosfolípidos.

C_x : es un coeficiente que describe la cooperatividad de la activación. Es una medida de la pendiente de la rampa de activación

$X_{0.5}$: es la fracción molar a la cual se observa la mitad del cambio máximo de la actividad.

Este modelo será utilizado en los capítulos siguientes para analizar los datos experimentales obtenidos.

CAPÍTULO 6

ACTIVIDAD Ca^{2+} -ATPASA DE LA PMCA RECONS-TITUIDA EN MICELAS MIXTAS DE LÍPIDO-DETERGENTE

6.1 Introducción

Dada la compleja dependencia que existe entre las proteínas de membrana y su entorno lipídico, ha sido de particular interés estudiar los mecanismos moleculares y factores que intervienen en dicha dependencia.

En este capítulo se describen los experimentos realizados con el fin de determinar el efecto del aumento de la fracción molar de distintas entidades fosfolípídicas en contacto directo con la Bomba de Ca^{2+} de Membrana Plasmática (PMCA).

6.2 PMCA reconstituida en micelas mixtas de DMPC/ $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$: La actividad Ca^{2+} -ATPasa depende de la composición micelar

Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) es un fosfolípido neutro cuyas colas hidrocarbonadas están formadas por ácidos grasos saturados de 14 carbonos. Ha sido ampliamente utilizado en la reconstitución de la bomba de calcio de membrana plasmática en micelas mixtas de fosfolípido-detergente (Villamil Giraldo y col., 2006; Mangialavori y col., 2009). En estas condiciones la bomba conserva todas sus propiedades funcionales (Filomatori y Rega., 2003) por lo que el sistema micelar se considera adecuado para el estudio de la PMCA y proteínas de membrana en general (le Maire y col., 1983).

La figura 6.1 muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la fracción molar de DMPC. El medio de reacción fue suplementado con $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ de manera que su concentración final, encada punto, fuera $120\ \mu\text{M}$. Mientras que las concentraciones de DMPC se incrementaron para obtener la fracción molar de DMPC (X_{DMPC}) mostradas en la figura.

Debido a que la CMC (concentración micelar crítica) de DMPC y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ es $6\ \text{nM}$ y $5\ \mu\text{M}$, respectivamente, es válido considerar que ambas moléculas formarán parte de la micela que contiene a la PMCA. En la figura 6.1, se pueden distinguir al menos dos fases: en la primera, la actividad de la bomba aumenta al incrementarse la X_{DMPC} hasta alcanzar un valor máximo para $X_{\text{DMPC}} = 0,2$; en la segunda, cuando la X_{DMPC} es superior a $0,3$ la actividad Ca^{2+} -ATPasa disminuye conforme dicha fracción molar aumenta.

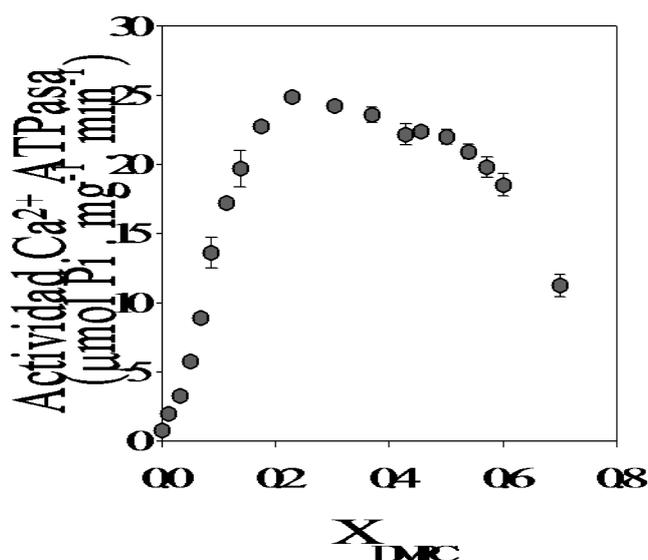


Figura 6.1: Efecto del aumento de la fracción molar de DMPC (X_{DMPC}) sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA. La actividad Ca^{2+} -ATPasa fue determinada como se describe en “Materiales y Métodos”, en presencia de $70\ \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$. La concentración de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ fue constante en todas las condiciones ($120\ \mu\text{M}$), mientras que la $[\text{DMPC}]$ fue variable para obtener la fracción molar deseada. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

6.3. La actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA depende de las características de la cadena hidrocarbonada del fosfolípido utilizado en su reconstitución

Mediante el estudio del efecto de diversos fosfolípidos sobre la bomba de calcio del retículo sarcoplasmático (SERCA), Lee ha sugerido que las hélices transmembrana podrían detectar cambios en el entorno lipídico inmediato, que se traducirían como cambios en la actividad enzimática (Lee, 1998). A su vez, también ha sugerido que los efectos de la estructura de los lípidos sobre las proteínas de membrana serían complejos y diferentes para cada proteína (Lee, 2011). Es en este sentido, de vital importancia aportar conocimientos sobre esta intrincada interacción entre una proteína de membrana y los lípidos del entorno.

Dilaurilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) son fosfolípidos cuyas cadenas hidrocarbonadas están formadas por 12; 14 y 16 carbonos, respectivamente. Dichas cadenas, están totalmente saturadas. Mientras que dimiristoleoilfosfatidilcolina (14:1), dipalmitelaidoilfosfatidilcolina (16:1) y dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), tienen cadenas de 14, 16 y 18 carbonos que presentan una insaturación en ambas cadenas hidrocarbonadas. Para estudiar el efecto de la longitud y la saturación de la cadena hidrocarbonada de un fosfolípido neutro, se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa cuando la PMCA es reconstituida en micelas mixtas con dichos fosfolípidos y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$.

6.3.1. La longitud de la cadena carbonada del fosfolípido afecta la actividad Ca^{2+} -ATPasa

Se ensayó la actividad Ca^{2+} -ATPasa cuando la PMCA fue reconstituida en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y DLPC, DMPC o DPPC. La fracción molar (X_{FL}) de fosfolípido en dichas micelas es, en todos los casos, igual a 0.2. A dicha X_{FL} se alcanza la máxima actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de DMPC (ver fig. 6.1).

En la figura 6.2, se puede observar que, al establecer una comparación entre los tres fosfolípidos ensayados, se alcanzó la mayor actividad Ca^{2+} -ATPasa cuando se utilizó DMPC mientras que la menor actividad se obtiene en presencia de DPPC. Para la reconstitución con DLPC, la actividad obtenida fue ligeramente menor a la obtenida con DMPC.

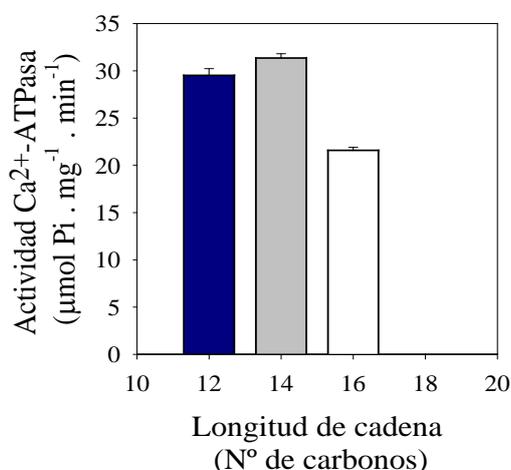


Figura 6.2: Efecto del aumento de la longitud de la cadena carbonada de cada fosfolípido sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA reconstituida en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y DLPC, DMPC o DPPC, en una fracción molar de lípido de 0.2 ($X_{\text{PL}}=0.2$) Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

6.3.2. La presencia de una insaturación y la longitud de la cadena carbonada del fosfolípido afectan la actividad Ca^{2+} -ATPasa

Se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, reconstituida en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y 14:1, 16:1 o 18:1 (DOPC). La fracción molar de fosfolípido utilizada fue, al igual que en el experimento anterior, 0.2 ($X_{\text{FL}} = 0.2$). Los resultados se muestran en la figura 6.3.

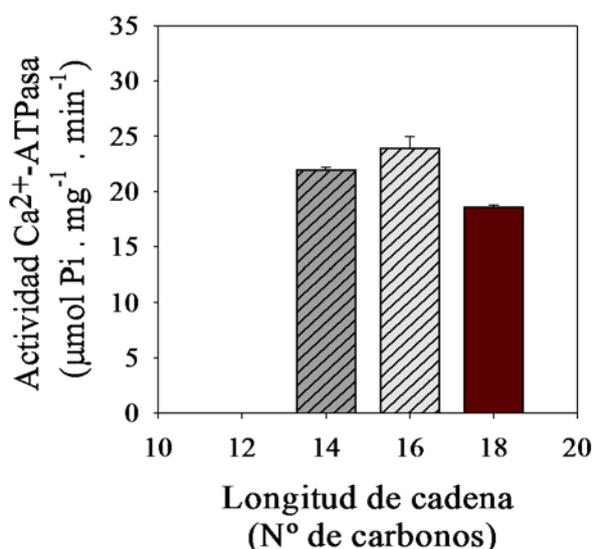


Figura 6.3: Efecto del aumento de la longitud de la cadena carbonada de fosfolípidos insaturados sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, reconstituida en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y 14:1, 16:1 o 18:1 (DOPC), a una fracción molar de lípido de 0.2 ($X_{\text{FL}}=0.2$).

La figura 6.3 muestra que se alcanzó un mayor valor de actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de 16:1. La menor actividad se obtuvo cuando la PMCA se reconstituyó en micelas mixtas con DOPC. Se obtuvo una actividad ligeramente menor en presencia de 14:1, con respecto a 16:1.

Una de las observaciones directas que se desprende de la comparación entre la figura 6.2 y la 6.3, es que la actividad Ca^{2+} -ATPasa alcanzada para la fracción molar utilizada ($X_{\text{FL}} = 0.2$), fue mayor en presencia de fosfolípidos completamente saturados.

Con los experimentos analizados en las secciones precedentes, pudimos demostrar que existen diferencias significativas en la actividad enzimática de la PMCA, cuando se la reconstituye a una fracción molar de activación máxima ($X_{\text{FL}}=0.2$), con fosfolípidos de distinto largo de cadena carbonada (saturados e insaturados). Nuestro siguiente objetivo, fue estudiar qué relación existe entre la fracción molar de cada uno de estos fosfolípidos y la actividad de la PMCA, para ello se diseñaron los siguientes experimentos.

6.4. La actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA depende de la fracción molar del fosfolípido (X_{FL}) y de las características del mismo

En las secciones anteriores, pudimos verificar que la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA difiere cuando ésta es reconstituida en micelas mixtas con una fracción molar fija de fosfolípidos ($X_{\text{FL}} = 0.2$), donde se varía la longitud y la insaturación de la cadena carbonada de este anfifilo. Teniendo en cuenta estos resultados, nos interesó conocer como varía la actividad Ca^{2+} -ATPasa con la fracción molar de los fosfolípidos previamente utilizados para reconstituir a la PMCA (en conjunto con el $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$). A su vez, se realizó el ajuste del modelo 1 (Capítulo 5) a los datos experimentales.

6.4.1. Reconstitución en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y fosfolípidos con cadenas carbonadas saturadas: La actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA depende de la fracción molar fosfolípídica en la fase micelar.

En la figura 6.4, se muestra un experimento en el cual se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la fracción molar de distintos fosfolípidos. Al igual que en el experimento mostrado en la figura 6.1, la concentración de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ fue constante y se aumentó la concentración del fosfolípido en cada condición.

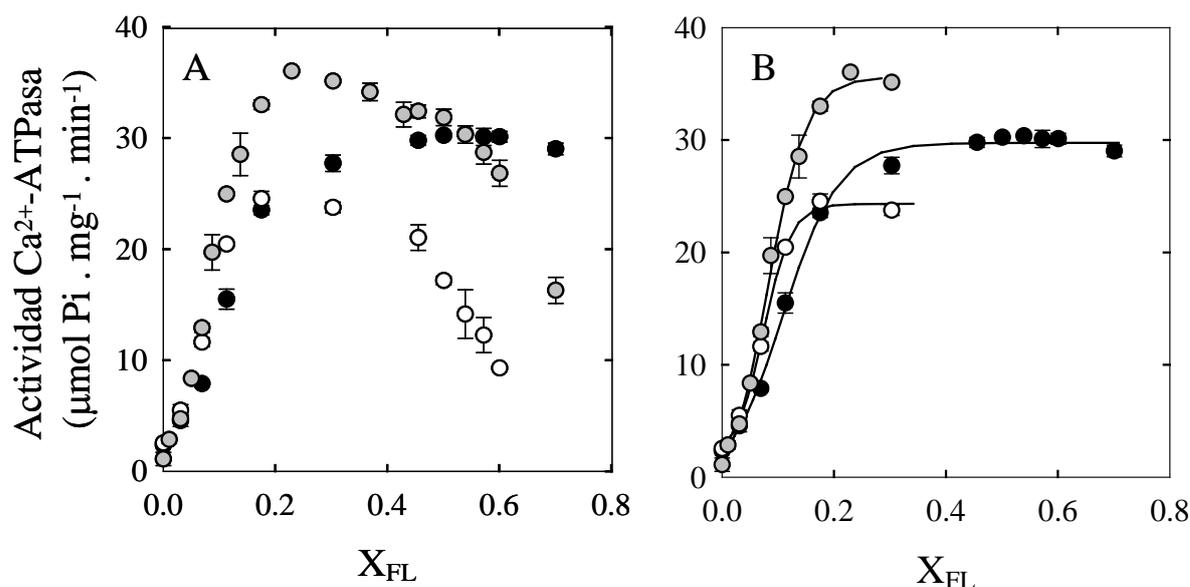


Figura 6.4: Efecto del aumento de la fracción molar de distintos fosfolípidos (X_{FL}) sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA. (A) La actividad Ca^{2+} -ATPasa fue determinada como se describe en "Materiales y Métodos", en presencia de micelas mixtas constituidas por distintas fracciones molares de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}/\text{DMPC}$ (círculos grises), $\text{C}_{12}\text{E}_{10}/\text{DLPC}$ (círculos negros) y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}/\text{DPPC}$ (círculos blancos). (B) La ecuación 1 fue ajustada a los datos experimentales mostrados en A –para detalles del modelo propuesto ver capítulo 5-. En el caso de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}/\text{DMPC}$ y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}/\text{DPPC}$, sólo fueron considerados para el ajuste de la ecuación 1 los valores de actividad Ca^{2+} -ATPasa hasta una $X_{\text{FL}} = 0.3$. Los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 1. Figura representativa de 3 experimentos independientes.

Al observar la figura 6.4 A podemos ver que: (1) La máxima actividad Ca^{2+} -ATPasa depende del fosfolípido que se utilice para formar la micela mixta y los valores obtenidos concuerdan con los observados en la figura 6.2; (2) cuando la bomba es reconstituida en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DMPC o $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DPPC la máxima actividad de la PMCA se observa a una $X_{\text{FL}} = 0.2$ mientras que para el caso de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DLPC dicho máximo parece verse a una XFL ligeramente mayor; (3) en presencia de DMPC (en concordancia con la figura 6.1) o DPPC se observan una fase de activación y otra de inhibición; (4) A diferencia de los dos fosfolípidos anteriores, cuando la bomba es reconstituida en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DLPC no se observa una fase de inhibición en el rango de XFL ensayado. En la Figura 6.4 B, se muestra el ajuste de la ecuación 1 (correspondiente al modelo desarrollado en el capítulo 5) a los datos experimentales, mostrados en la Figura 6.4, A.

$$A = \frac{A_1 - A_0}{1 + e^{-c_x(X - X_{0.5})}} + A_0$$

donde " A_0 " corresponde a la asíntota inferior de la curva sigmoidea y se relaciona con la actividad Ca^{2+} -ATPasa cuando la X_{FL} es igual a *cero*—es decir cuando la bomba se encuentra reconstituida en micelas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ — " A_1 " es la asíntota superior de la curva y se relaciona con el valor máximo de actividad —es decir, cuando la X_{FL} tiende a 1—; $X_{0.5}$ corresponde a la X_{FL} a la que se observa la mitad del efecto máximo y c_x representa un coeficiente de cooperatividad empírico, relacionado con la pendiente máxima de las curvas (DodesTraian y col., 2012).

Es importante destacar que en el caso de DMPC y DPPC, se realiza el ajuste hasta $X_{\text{FL}} = 0.3$ (se excluye el componente inhibitorio de la curva). El modelo propuesto, no predice el comportamiento observado a fracciones molares mayores a 0.3. En presencia de micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DLPC, no se observa (Figura 6.4, A y B) una fase inhibitoria en la curva, podemos ver que la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA se mantiene constante a partir de fracción molar 0.3 ($X_{\text{FL}} = 0.3$), en el resto del rango ensayado. El modelo propuesto, predice el comportamiento observado para la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de DLPC.

En la tabla 1, se encuentran los parámetros obtenidos a partir del ajuste de la ecuación 1 a los datos experimentales (figura 6.4, B). Podemos observar que no existieron diferencias significativas en el parámetro $X_{0.5}$ obtenido para cada lípido. Esto nos indica que la enzima alcanza el 50% del efecto de activación a una XFL similar (aproximadamente 0.1) independientemente de la longitud de la cadena carbonada del fosfolípido utilizado para su reconstitución (DLPC, DMPC o DPPC, en este caso). Como hemos evidenciado en la sección 6.3.1, existen diferencias en los máximos de actividad alcanzados (parámetro A_1) en presencia de DLPC, DMPC o DPPC, Se observa que se alcanza un mayor valor con DMPC, luego con DLPC y por último con DPPC. Centrándonos en el parámetro c_x , podemos ver que existieron diferencias para los 3 fosfolípidos ensayados. Se observa una mayor pendiente en presencia de DPPC, luego en presencia de DMPC y finalmente, la menor pendiente se obtiene con DLPC. Este parámetro está relacionado con la eficacia del fosfolípido para producir el efecto activador.

Curiosamente, se halló un mayor c_x (mayor eficacia) en presencia de DPPC, si bien en presencia de este fosfolípido se alcanzó la menor actividad Ca^{2+} -ATPasa máxima. Con respecto al parámetro A_0 , que significaría la actividad Ca^{2+} -ATPasa reconstituida en micelas compuestas enteramente con detergentes, podemos observar en la tabla 1, que presenta valores negativos (a excepción de DPPC), esto no sería esperable y podría especularse que se trate de predicciones fallidas del modelo que presentan un error considerable.

Tabla1: Parámetros obtenidos del ajuste de la ecuación 1 a los datos experimentales, derivados de la figura 6.4.

Fosfolípido	A_0 ($\mu\text{mol Pi. mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	A_1 ($\mu\text{mol Pi. mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	$X_{0.5}$	c_x
DLPC	-0.9 ± 0.5	26.2 ± 0.2	0.123 ± 0.003	20 ± 1
DMPC	-2.3 ± 1.2	36.8 ± 1.0	0.082 ± 0.003	29 ± 1
DPPC	1.5 ± 0.4	17.9 ± 0.2	0.082 ± 0.003	40 ± 4

6.4.2. Reconstitución en micelas mixtas de $C_{12}E_{10}$ y fosfolípidos con cadenas insaturadas: La actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA depende de la fracción molar fosfolípídica en la fase micelar.

Se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA reconstituida en micelas mixtas de $C_{12}E_{10}$ y distintos fosfolípidos con cadenas carbonadas insaturadas. Para la reconstitución de la PMCA, se ensayó el mismo grupo de fosfolípidos insaturados utilizados en la sección 6.3.2 (14:1, 16:1 y DOPC).

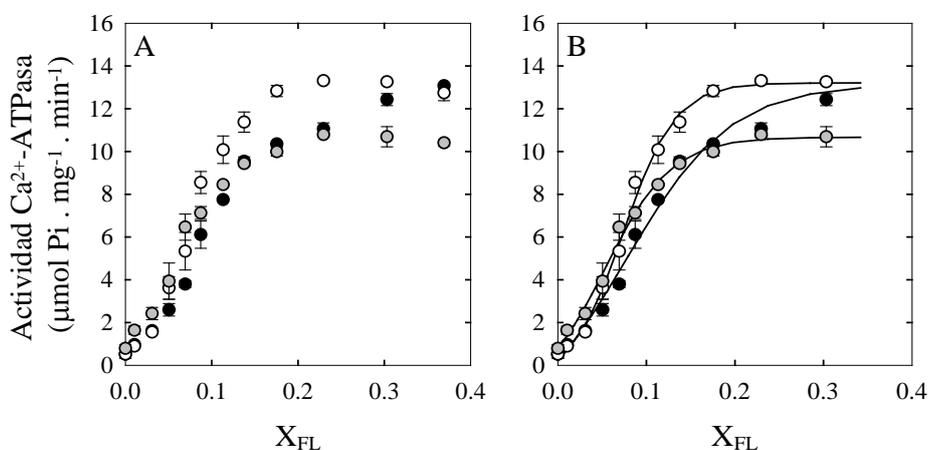


Figura 6.5: Efecto del aumento de la fracción molar de cada lípido (X_{FL}) sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA. (A) La actividad Ca^{2+} -ATPasa fue determinada como se describe en "Materiales y Métodos", en presencia de micelas mixtas constituidas por distintas fracciones molares de $C_{12}E_{10}/14:1$ (círculos negros), $C_{12}E_{10}/16:1$ (círculos blancos) y $C_{12}E_{10}/DOPC$ (círculos grises). (B) La ecuación 1 fue ajustada a los datos experimentales hasta $X_{FL} = 0.3$ –para detalles del modelo propuesto ver capítulo 5-. Los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 2. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

En la figura 6.5, podemos observar la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la fracción molar de fosfolípidos de cadenas carbonadas insaturadas. La figura 6.5 B, muestra el ajuste de la ecuación 1 a los datos experimentales hasta $X_{FL} = 0.3$. Si bien los valores de actividad son mostrados hasta una $X_{FL} = 0.45$, cuando la X_{FL} es 0.7 se obtiene en todos los casos una inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa, de forma similar a lo observado para DMPC y DPPC (dato no mostrado). Al igual que para el caso de los fosfolípidos de cadena saturada, el ajuste se realiza hasta hasta $X_{FL} = 0.3$ (figura 6.5 B).

En la figura 6.5, podemos observar la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la fracción molar de fosfolípidos de cadenas carbonadas insaturadas. La figura 6.5 B, muestra el ajuste de la ecuación 1 a los datos experimentales hasta $X_{\text{FL}}=0.3$. Si bien los valores de actividad son mostrados hasta una $X_{\text{FL}} = 0.45$, cuando la X_{FL} es 0.7 se obtiene en todos los casos una inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa, de forma similar a lo observado para DMPC y DPPC (dato no mostrado). Al igual que para el caso de los fosfolípidos de cadena saturada, el ajuste se realiza hasta hasta $X_{\text{FL}} = 0.3$ (figura 6.5 B).

En la tabla 2, se muestran los parámetros obtenidos a partir del ajuste de la ecuación 1 a los datos experimentales (Figura 6.5 B). Notar que al igual que en presencia de fosfolípidos con cadenas carbonadas totalmente saturadas, el parámetro $X_{0.5}$ - que representa a la X_{FL} a la cual se alcanza el 50% del efecto activador-, es similar, independientemente de la longitud de la cadena carbonada de fosfolípido (insaturado). Similar a lo mostrado en la sección 6.3.2; la actividad máxima alcanzada (parámetro A_1), fue en presencia de micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}/14:1$ y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}/16:1$ no fue significativamente diferente, mientras que se obtuvo un valor inferior en presencia de (18:1) DOPC. El parámetro c_x , también resultó diferente para los distintos fosfolípidos insaturados ensayados. El menor valor se obtuvo en presencia de 14:1 y el mayor en presencia de 16:1. Podemos notar que en el caso de los fosfolípidos insaturados no se observó un aumento de dicho parámetro, a medida que aumenta el largo de cadena carbonada.

Tabla 2: Parámetros obtenidos del ajuste de la ecuación 1 a los datos experimentales, derivados de la figura 6.5.

Fosfolípido	A_0 ($\mu\text{mol Pi. mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	A_1 ($\mu\text{mol Pi. mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	$X_{0.5}$	c_x
14:1	-3.3 ± 2.3	13.2 ± 0.3	0.080 ± 0.020	17 ± 3
16:1	-0.6 ± 0.6	13.2 ± 0.3	0.075 ± 0.004	34 ± 4
DOPC	-1.5 ± 1.3	10.7 ± 0.3	0.050 ± 0.010	27 ± 4

6.5 DISCUSIÓN

La dependencia de la actividad de proteínas de membrana con su entorno lipídico ha sido estudiada previamente en diversos sistemas. Lee y col. abocaron estudios en la Bomba de Ca^{2+} del Retículo Sarcoplásmico (SERCA), principalmente en bicapas compuestas por diversos fosfolípidos, excluyendo el detergente del medio. Como ha sido mencionado previamente en el capítulo 2, existen pocos antecedentes en el estudio de la bomba de calcio de membrana plasmática y la influencia del entorno lipídico. Además, es importante destacar, que de los estudios realizados con la PMCA, no existen antecedentes directos que relacionen la actividad de la proteína reconstituida en micelas mixtas (Fosfolípido-detergente) con el largo de las cadenas carbonadas de los fosfolípidos y la dinámica del entorno de reconstitución asociado.

En el capítulo 6 demostramos la dependencia de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA con la fracción molar de fosfolípidos. Además, pudimos observar que la actividad es mayor en presencia de fosfolípidos de cadenas carbonadas totalmente saturadas, con respecto a fosfolípidos con cadenas carbonadas insaturadas. Es posible que sea más exitosa la reconstitución con fosfolípidos de cadena carbonada saturada (en términos de la actividad Ca^{2+} -ATPasa) ya que estos proporcionarían un entorno mucho más "ordenado", similar al entorno lipídico que se puede encontrar en la membrana plasmática. La membrana del retículo sarcoplásmico está enriquecida en glicerofosfolípidos principalmente de cadenas insaturadas, otorgando a las isoformas de la SERCA un entorno más fluido que el de la membrana plasmática (Borchman y col., 1982). En coincidencia con esto último, Lee y col., muestran que la mayor actividad Ca^{2+} -ATPasa en SERCA se observa cuando ésta es reconstituida en presencia de fosfolípidos de cadenas insaturadas.

Hemos observado que el modelo propuesto por DodesTraian y col. (2012), que relaciona la actividad Ca^{2+} -ATPasa con la fracción molar de fosfolípidos, describe los datos experimentales hasta $X_{\text{FL}} = 0.3$ para la mayoría de los fosfolípidos utilizados en la reconstitución. La excepción esta representada por la reconstitución en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DLPC, donde el modelo describe los datos experimentales en todo el rango ensayado (de $X_{\text{FL}} = 0$ a $X_{\text{FL}} = 0.7$), manteniéndose constante la actividad a partir de $X_{\text{FL}} = 0.3$. En el resto de los sistemas fosfolípido-detergente ensayados en el presente estudio, se obtuvo una disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa a partir de dicha fracción molar. Con respecto a los parámetros derivados del ajuste del modelo a los datos, podemos decir que no existieron diferencias significativas en el $X_{0.5}$ obtenido para cada fosfolípido ensayado. Para la mayoría, el valor (considerando el error experimental) se mantuvo alrededor de 0.1, lo que indica que a dicha fracción molar, la proteína alcanza la mitad de la activación por fosfolípidos, independientemente del largo de cadena del mismo o de la presencia de insaturaciones en la misma. El parámetro c_x arrojó un valor distinto para cada fosfolípido ensayado en la reconstitución. Este parámetro esta relacionado con la eficacia de cada lípido para promover la activación de la PMCA. Resulta curioso el hecho que, en la reconstitución con lípidos saturados, c_x aumentó con el largo de la cadena carbonada. Aunque para establecer una relación directa deberíamos ensayar la reconstitución de la PMCA con mayor cantidad de fosfolípidos con distintos largos de cadena.

Es probable que a partir de $X_{\text{FL}} = 0.4$, el sistema comience una etapa de transición, que podría culminar con la formación de algunas vesículas en las que quede inmersa la proteína. Ha sido demostrado por Hao y col. (1994) que la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA es menor cuando se reconstituye en liposomas que en micelas mixtas (fosfolípido-detergente). Sin embargo, esta hipótesis no explicaría el caso de la reconstitución en DLPC. Podríamos pensar que al aumentar la X_{FL} , aumenta la proporción de agregados lipídicos, de los que se excluye a la PMCA, quedando reconstituida en micelas mixtas compuestas mayormente por detergente. Una hipótesis que puede explicar el caso de la reconstitución en DLPC es que, dada su corta longitud de cadena, tenga tendencia a permanecer en la fase micelar, formando micelas mixtas más estables en todo el rango ensayado. Con el objetivo de explicar las diferencias halladas en la actividad Ca^{2+} -ATPasa, se procederá a estudiar, en ausencia de PMCA, los procesos dinámicos que presenta el sistema lípido-detergente cuando se incrementa la X_{FL} .

CAPÍTULO 7

ESTUDIO DE LA TRANSICIÓN MICELA-VESÍCULA EN SISTEMAS DETERGENTE-FOSFOLÍPIDO

7.1. Introducción

En capítulos anteriores, se pudo evidenciar la diferencia existente en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, reconstituida en sistemas compuestos por $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y distintas entidades fosfolípídicas. Se obtuvo una actividad máxima, y posteriormente, una disminución de la misma (en presencia de cada uno de los fosfolípidos ensayados, a excepción de DLPC). En presencia de estos resultados, fue de particular interés evaluar si existen cambios de alguna índole en los sistemas micelares previamente ensayados, que puedan explicar las diferencias obtenidas en la actividad Ca^{2+} -ATPasa.

Han sido empleadas diversas técnicas para el estudio de la transición vesícula-micela (Almog y col., 1986; Ollivion y col., 1988; Vinsón y col., 1989; Levy y col., 1990). En este capítulo, se buscó explorar la transición reversa (micela-vesícula) mediante dispersión de luz (denominada SLS, del inglés "Static Light Scattering"). La misma, es una técnica sencilla que nos permitirá explorar nuestro sistema micelar, cuando se produce el aumento de la fracción molar de fosfolípidos (X_{FL}). Se determinará, además, el radio hidrodinámico promedio de las poblaciones presentes en el sistema, mediante la técnica de FCS (del inglés Fluorescence Correlation Spectroscopy). Esta técnica permite inferir, a partir del análisis de las fluctuaciones en intensidad lumínica que se producen cuando moléculas atraviesan un pequeñísimo volumen de excitación (del orden de 1-10 femtolitros), el tiempo de residencia medio en ese volumen que puede luego relacionarse con el radio hidrodinámico de las partículas fluorescentes.

Además, se utilizará un ionóforo de Ca^{2+} para evaluar si la caída de la actividad Ca^{2+} -ATPasa, se debe a la formación de vesículas que acumulen Ca^{2+} en su interior y que por este motivo, se genere un potencial que detenga el funcionamiento de la bomba.

7.2. La dispersión de luz ($\lambda = 470\text{nm}$) aumenta cuando predominan lípidos en sistemas lípido (PC) - detergente ($\text{C}_{12}\text{E}_{10}$): El sistema no experimenta variaciones en el tiempo

Cuando en un sistema de anfifilos ocurre una transición micela-vesícula la turbidez del medio cambia. De esta forma, es posible seguir estas transiciones mediante dispersión de luz a 90° (*light scattering*). La dispersión de luz aumenta al aumentar el tamaño de las partículas pero también sufre modificaciones en función de la forma de las partículas de la muestra. Por lo tanto, considerando que el sistema de anfifilos se modifica en función de la X_{FL} utilizada, nuestro primer objetivo fue evaluar la transición micela-vesícula que ocurría en el medio de reacción en el que se determina la actividad de la bomba.

En principio, se ensayó el sistema compuesto por micelas mixtas $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DMPC en un medio típico de medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa. Se utilizaron $X_{\text{FL}} = 0.2$ y $X_{\text{FL}} = 0.7$, condiciones de máxima activación e inhibición respectivamente para la mayor parte de los lípidos ensayados. Se incubaron, sin agitación, cada una de las mezclas ensayadas durante 50 min, a 37°C . Se seleccionó este tiempo de incubación dada su similitud con los tiempos utilizados para la medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa. La figura 7.1 muestra los resultados obtenidos, en ella podemos ver que existe un aumento de la dispersión de luz ($\lambda = 470\text{nm}$) en el sistema compuesto por una $X_{\text{FL}} = 0.7$ con respecto a la $X_{\text{FL}} = 0.2$.

Además, podemos ver que el sistema no experimenta variaciones significativas en la dispersión de luz en el tiempo ensayado (50 min a 37°C), en ninguna de las dos fracciones molares seleccionadas, lo que demuestra que el sistema es estable en los tiempos ensayados, o bien que al menos no presenta variaciones en la forma de las micelas/vesículas. El paso siguiente fue estudiar la transición micela-vesícula para las XFL utilizadas previamente para las medidas de actividad.

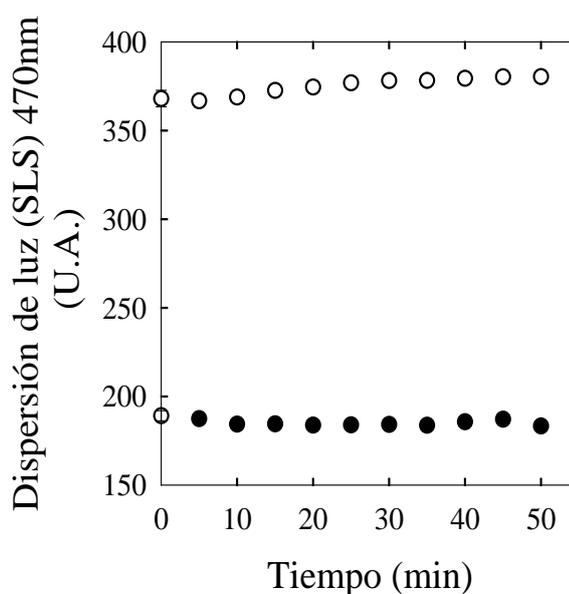


Figura 7.1: Dispersión de luz ($\lambda = 470\text{nm}$) en función del tiempo de incubación del sistema $C_{12}E_{10}/\text{DMPC}$ a 37°C. Las fracciones molares de fosfolípidos (X_{FL}) ensayadas fueron: 0.2 (círculos negros) y 0.7 (círculos blancos). Cada punto corresponde al promedio de los sucesivos puntos de las curvas obtenidas midiendo durante 2 min, a lo largo de los 50 min de incubación. Las medidas y condiciones experimentales son explicitadas en Materiales y Métodos.

7.3. Aumento de la dispersión de luz ($\lambda = 470\text{nm}$) en función de la X_{FL} en sistemas lípido (PC) - detergente ($C_{12}E_{10}$): ensayos con fosfolípidos de cadenas saturadas.

En el capítulo anterior, demostramos que existen diferencias en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA al ser reconstituida en micelas mixtas de $C_{12}E_{10}$ y fosfolípidos con distinta naturaleza de cadena carbonada. En los experimentos de actividad realizados en presencia de micelas mixtas de $C_{12}E_{10}$ y DMPC o DPPC (Capítulo 6, sección 6.3.1 y 6.4.1), se observó una disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa a partir de una fracción molar de fosfolípidos de 0.4 ($X_{FL} = 0.4$). Dicho comportamiento, también se observó al reconstituir la proteína en micelas mixtas de $C_{12}E_{10}$ y fosfolípidos de cadena carbonada insaturada (14:1, 16:1 y DOPC), a partir de $X_{FL} = 0.4$. En cambio, este comportamiento de inhibición, no se evidenció en presencia de micelas mixtas de $C_{12}E_{10}$ y DLPC, en el rango de fracciones molares ensayadas.

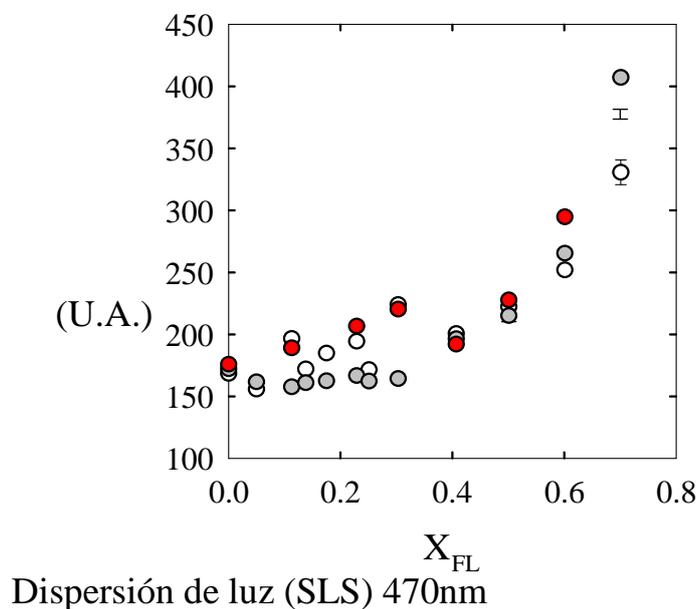


Figura 7.2: Dependencia de la dispersión de luz ($\lambda = 470\text{nm}$) con la fracción molar de fosfolípidos (X_{FL}). Los círculos blancos corresponden a micelas mixtas de $C_{12}E_{10}/DLPC$, los grises a $C_{12}E_{10}/DMPC$ y los rojos a $C_{12}E_{10}/DPPC$. Las medidas y condiciones experimentales fueron las explicitadas en Materiales y Métodos (Capítulo 4, sección 4.8).

Por estas diferencias halladas en actividad, y en vista de los resultados obtenidos en la sección anterior, donde se pudo apreciar un importante aumento de la dispersión de luz a $X_{FL} = 0.7$, se realizaron experimentos del mismo tipo para estudiar la posible existencia de una transición micela-vesícula en todo el rango de X_{FL} previamente ensayadas. Las medidas se realizaron según lo explicitado en Materiales y Métodos (Capítulo 4, sección 4.8) y se exploraron sistemas conteniendo micelas mixtas de DLPC, DMPC y DPPC. Los resultados obtenidos para dichos sistemas, se muestran en la figura 7.2.

En esta figura, se observa la dependencia de la dispersión de luz con X_{FL} . Podemos ver que hasta $X_{FL} = 0.4$ no existe un aumento neto de la dispersión de luz a 470 nm. A partir de dicha fracción molar de fosfolípidos, se incrementa la dispersión en el resto del rango ensayado. Estableciendo una comparación entre los 3 sistemas ensayados ($C_{12}E_{10}/DLPC$; $C_{12}E_{10}/DMPC$; $C_{12}E_{10}/DPPC$), se observa un comportamiento similar para todos.

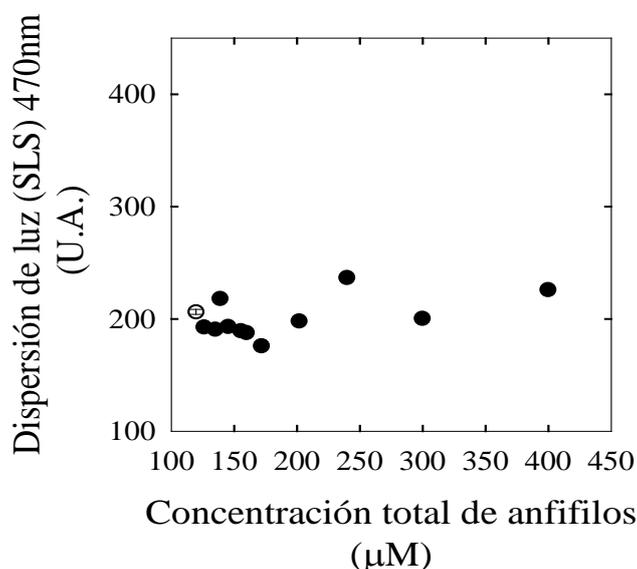


Figura 7.3: Dependencia de la dispersión de luz ($\lambda = 470\text{nm}$) en función de la concentración (μM) de anfífilos totales. Las condiciones experimentales y las concentraciones ensayadas, fueron las mismas que se utilizaron para el experimento de la Figura 7.2 pero se reemplazó la concentración de fosfolípidos por una idéntica concentración de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$

Los resultados obtenidos, con la técnica de dispersión de luz, son análogos a los que suelen hallar para sistemas fosfolípido-detergente (no iónico) en bibliografía (Vinson y col., 1989; Levy y col., 1990; De la Maza y Parra, 1996), donde se evidencia una caída de la dispersión de luz durante el proceso de transición de vesícula a micela (aquí, estamos estudiando el proceso inverso).

Con el objetivo de descartar que el aumento en la dispersión de luz (a 470nm) se deba al incremento de la cantidad de anfífilos totales (en este caso, fosfolípidos y detergente), se diseñó un experimento en el que se reemplazan los moles de fosfolípido agregados, por moles de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$. Es decir que, ahora se está aumentando el número total de partículas en el sistema, pero estas se encuentran totalmente compuestas por $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y en consecuencia, en forma micelar. Los resultados del experimento se pueden observar en la figura 7.3.

Podemos observar que no existe un aumento de la dispersión de luz (a 470nm) en todo el rango de concentraciones totales de anfífilos ensayadas. Es decir que el aumento de la dispersión observado en la figura 7.2, puede ser atribuido a la transición que experimenta el sistema compuesto por fosfolípidos/ $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$, cuando se aumenta la fracción molar de fosfolípidos. Se puede descartar que el aumento de la dispersión, sea producto del aumento de la concentración de anfífilos totales.

7.4. Caracterización del sistema fosfolípido/ $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ mediante la técnica de espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS)

Habiendo explorado algunas de las propiedades biofísicas del sistema, pudimos demostrar la existencia de una transición micela-vesícula en el rango de las fracciones molares ensayadas. El paso siguiente fue utilizar la técnica de FCS (del inglés, "fluorescence correlations spectroscopy") para

determinar coeficientes de difusión y calcular los radios hidrodinámicos de las micelas/vesículas presentes en el sistema. Esta técnica permite obtener información complementaria a los resultados anteriores, ya que nos permite obtener información sobre el tamaño y homogeneidad de los sistemas lípido-detergente en los que está inmersa la PMCA en el momento de la medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa.

En condiciones similares a las que se realizaron los experimentos de dispersión de luz (Sección 7.3), se sometieron sistemas compuestos por micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y DLPC o DMPC (acompañados por el medio de reacción previamente mencionado) a medidas mediante la técnica de FCS.

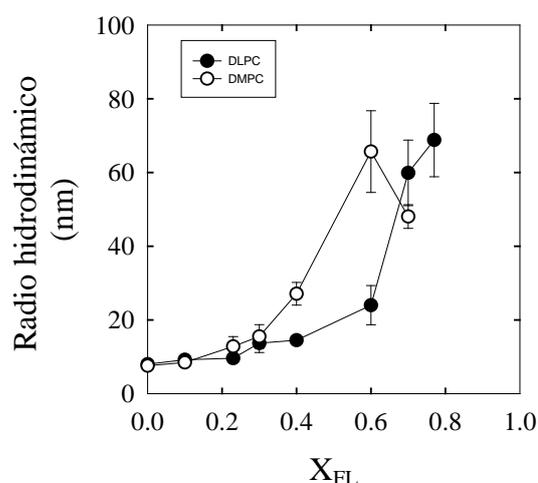


Figura 7.4: Radio hidrodinámico de las micelas presentes en el sistema fosfolípido-detergente ($\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DLPC) en función de la X_{FL} . Las medidas fueron realizadas según lo explicitado en "Materiales y Métodos" (Sección 4.8).

Para poder realizar dichas medidas, se incluyó un análogo fluorescente de fosfatidiletanolamina (Rho-PE) que se incorporará como sonda en las micelas mixtas. Se obtuvieron los radios hidrodinámicos de las micelas/vesículas presentes en los sistemas fosfolípido-detergente ensayados en el rango de $X_{FL} = 0$ a 0.77. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 7.4.

Como podemos observar en la Figura 7.4, el radio hidrodinámico de las micelas/vesículas aumenta a medida que se incrementa la fracción molar de fosfolípidos (X_{FL}). A partir de $X_{FL} = 0.3$ se observa el cambio de pendiente y aumento del radio hidrodinámico para el sistema de micelas mixtas compuesto por $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC. A partir de ese punto, se registra un aumento neto de este parámetro, con el aumento concomitante del error asociado al cálculo (recordemos que se determina el coeficiente de difusión de las partículas promedio, y a partir de ello, se calcula el radio hidrodinámico, para más detalles, consultar "Materiales y Métodos", Sección 8). Este aumento del error podría asociarse al incremento de la presencia de agregados en el sistema, que podrían dificultar las determinaciones. Centrándonos en el sistema compuesto por $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DLPC, podemos decir que si bien se evidencia un aumento en el radio hidrodinámico a partir de $X_{FL} = 0.3$, el cambio neto (comparado con el sistema formado por $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC) se produce a fracciones molares de fosfolípidos mayores (aproximadamente, $X_{FL} = 0.6$). También se observa un aumento del error asociado al cálculo, al igual que se observó en el sistema micelar previamente ensayado.

7.5. El agregado de un ionóforo de Ca^{2+} al medio de reacción, no revierte la inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa presente en X_{FL} mayores a 0.4.

En el capítulo 6, pudimos demostrar que la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, disminuye a partir de una $X_{\text{FL}}=0.4$, en presencia de sistemas lípido-detergente compuestos por la mayoría de los fosfolípidos ensayados y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ (Figura 6.4, A). La excepción fue el sistema compuesto por DLPC- $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ (Figura 6.4, A), en el cual la actividad Ca^{2+} -ATPasa alcanzó un máximo y no disminuyó en el rango ensayado. En secciones previas del presente capítulo, se evidenció la transición micela-vesícula en los sistemas fosfolípido-detergente, mediante la técnica de dispersión de luz (Figura 7.2). Además, utilizando la técnica de FCS, pudimos determinar que existe un aumento del radio hidrodinámico promedio (y del porcentaje de agregados) de las micelas/vesículas a medida que se incrementa la XFL (Figura 6.4). A raíz de estos resultados, se hipotetizó que la caída de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA a partir de $X_{\text{FL}}=0.4$ podría ocurrir como consecuencia de la formación de vesículas que acumularan el Ca^{2+} transportado por la PMCA, en su interior, disminuyendo así, la actividad de la enzima. Para intentar comprobar dicha hipótesis, se diseñó una serie de experimentos en los que se utilizó un ionóforo de Calcio (denominado A23187 o bien, Calimicina). Éste permite la liberación del Ca^{2+} retenido en su interior y la consecuente recuperación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa.

7.5.1. El agregado del ionóforo de Ca^{2+} provoca la pérdida de la capacidad de captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en vesículas invertidas

Con el objetivo de evaluar el funcionamiento del ionóforo de Ca^{2+} (A23187 o Calimicina), se realizó un experimento en el que se midió la incorporación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a vesículas invertidas (*IOVs del inglés "in-out vesicles"*), en función del tiempo. Las IOVs fueron obtenidas a partir de membranas de glóbulos rojos humanos como se describe en Materiales y Métodos.

En la figura 7.5 podemos ver el aumento de la incorporación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a medida que aumenta el tiempo de reacción (en presencia de ATP). La PMCA, única ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática del eritrocito, es la responsable de dicho transporte hacia el interior de la vesícula. En el minuto 15, se agrega el ionóforo de Ca^{2+} al medio de reacción y vemos que existe una caída neta de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Dicha molécula, forma complejos con cationes divalentes (Pfeiffer y col., 1974) y tiene alta especificidad por el Ca^{2+} . De esta manera, permite que los cationes divalentes crucen las membranas biológicas (Pressman, 1976).

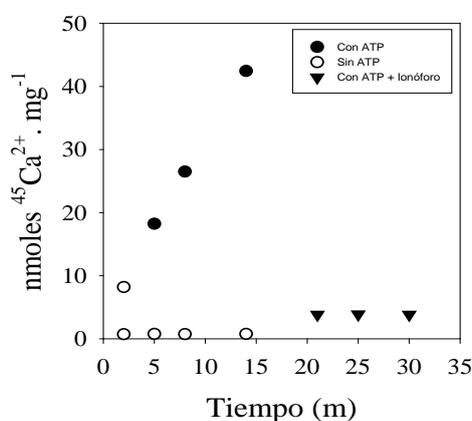


Figura 7.5: Captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en IOVs de membranas de eritrocitos humanos en función del tiempo de reacción. Se hacen medidas sin ATP (se utiliza como blanco), con agregado de ATP y luego con agregado de ionóforo de Ca^{2+} al medio de reacción. Las condiciones experimentales fueron explicitadas en Materiales y Métodos.

7.5.2. No existieron diferencias en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA reconstituída en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC ($X_{\text{FL}}=0.7$) ante el agregado del ionóforo de Ca^{2+}

Una vez evaluado el funcionamiento del ionóforo de Ca^{2+} en IOVs, se realizó un experimento para medir la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, similar a los realizados en el capítulo 6. El objetivo principal de este experimento era reproducir las condiciones de medida de actividad de la PMCA purificada, reconstituída en sistemas lípido-detergente, compuestos por distintas fracciones molares fosfolipídicas (X_{FL}). El sistema de anfifilos seleccionado para reconstituir a la proteína fue $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC. Las X_{FL} que se ensayaron fueron 0.2 (condiciones de máxima activación) y 0.7 (condiciones de inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa). Los resultados del experimento encuentran en la figura 7.6.

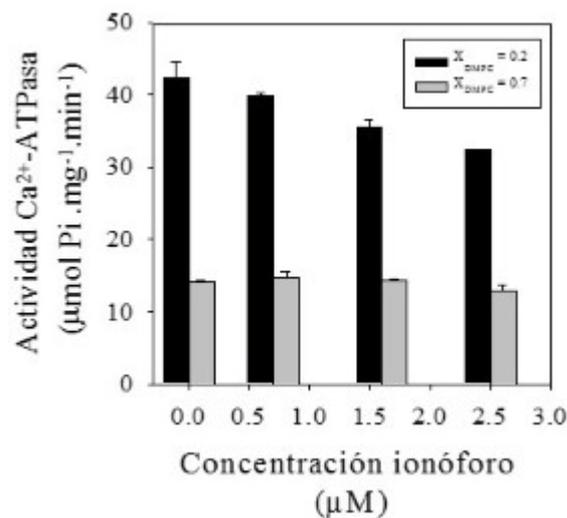


Figura 7.6: Actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la concentración del ionóforo de Ca^{2+} (A23187 o Calimicina) agregado al medio de reacción. Se determinó la actividad de la PMCA reconstituída en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC, en las X_{FL} indicadas en la figura, durante 40 min a 37°C.

Como podemos observar en la figura 7.6, no existieron diferencias significativas en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA ante la adición de ionóforo de Ca^{2+} al medio de reacción. Si la hipótesis previamente planteada, era correcta, debería haber existido un aumento de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de alguna de las concentraciones de ionóforo ensayada, a $X_{\text{FL}}=0.7$. Al no existir diferencias significativas en la actividad, en esta X_{FL} , con el agregado del ionóforo de Ca^{2+} , podemos inferir, que la inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa que se observa a partir de X_{FL} mayores a 0.4, no ocurriría por la acumulación del ión en las vesículas que se comenzarían a formar en el medio, a partir de dicha fracción molar. Además, a una $X_{\text{FL}}=0.2$, se puede observar una ligera inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa a medida que aumenta la concentración de ionóforo de Ca^{2+} , fenómeno que no se observa a $X_{\text{FL}}=0.7$.

7.6. Discusión

En el Capítulo 6, pudimos demostrar que la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, disminuye a partir de una $X_{\text{FL}}=0.4$, en presencia de sistemas lípido-detergente compuestos por la mayoría de los fosfolípidos ensayados y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ (Figura 6.4 A). La excepción fue el sistema compuesto por DLPC- $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ (Figura 6.4 A), en el cual la actividad Ca^{2+} -ATPasa alcanzó un máximo que no disminuyó en todo el rango ensayado. En secciones previas del presente capítulo, se evidenció la transición micela-vesícula en los sistemas fosfolípido-detergente, mediante la técnica de dispersión de luz (Figura 7.2). Además, utilizando la técnica de FCS, pudimos determinar que existe un aumento del radio hidrodinámico promedio (y del porcentaje de agregados) de las micelas/vesículas a medida que se incrementa la X_{FL} (Figura 7.4). Si bien con la técnica de dispersión de luz (Figura 7.2) se obtuvieron resultados similares para los sistemas DMPC- $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y DLPC- $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$, con la técnica de FCS, al estudiar la transición en el rango de fracciones molares ensayadas, se observó una transición a una X_{FL} similar pero no tan marcada en presencia de DLPC. Se comienza a evidenciar un aumento marcado del radio hidrodinámico, comparable al evidenciado en presencia de DMPC, a fracciones molares mayores (aproximadamente 0.6). A raíz de estos resultados, se hipotetizó que la caída de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA a partir de $X_{\text{FL}}=0.4$ podría ocurrir como consecuencia de la formación de vesículas que acumularan Ca^{2+} en su interior, disminuyendo así la actividad de la enzima. En la sección 7.5 del presente capítulo, se pudo refutar la hipótesis previamente formulada, ya que la incorporación de un ionóforo de Ca^{2+} provocó la caída de la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en vesículas invertidas de membranas de eritrocitos humanos, pero en la proteína purificada y reconstituida en una $X_{\text{FL}}=0.7$, no produjo cambios, es decir, no se revierte la inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa.

Con los datos obtenidos hasta el momento, podemos afirmar que existe una transición a partir de $X_{\text{FL}}=0.4$, en los sistemas fosfolípido-detergente ensayados. Dicha transición se pudo evidenciar tanto con la técnica de dispersión de luz como con la técnica de FCS. Sin embargo, con la técnica de FCS pudimos observar diferencias entre la fracción molar a la cual se alcanza el mayor aumento del radio hidrodinámico a lo largo de todas las fracciones molares ensayadas. Si bien, con los experimentos hasta ahora realizados, no hemos podido hallar un argumento que explique porque no se observa inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa a partir de $X_{\text{FL}}=0.4$ en presencia de micelas mixtas de DLPC- $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$, las diferencias observadas en el radio hidrodinámico de las micelas mixtas formadas por distintas X_{FL} de éste último o DMPC sugieren que el sistema puede tener diferencias biofísicas que afecten la actividad de la bomba.

CAPÍTULO 8

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES PRODUCIDOS EN LA ACTIVACIÓN DE PMCA POR FOSFOLÍPIDOS

8.1 Introducción

En los capítulos anteriores hemos hecho un análisis de la activación de la PMCA por fosfolípidos y comenzamos a analizar como posibles cambios en la biofísica del sistema de anfífilos en que la PMCA se encuentra solubilizada pueden estar acompañando el comportamiento observado. En este capítulo vamos a enfocarnos en estudiar posibles cambios conformacionales en PMCA que puedan ser asociados a su activación por fosfolípidos.

Las técnicas espectroscópicas, basadas en estudiar como la energía electromagnética interactúa con la materia, han sido muy utilizadas en el estudio estructural de proteínas. En particular hemos utilizado espectroscopía de fluorescencia que permite analizar cambios en la estructura terciaria de las proteínas (Kozachkovy Padan, 2011); y dicroísmo circular en el UV lejano que permite detectar cambios en la estructura secundaria de las proteínas (Román y col., 2012).

8.2 La activación de PMCA está asociada a sutiles cambios conformacionales

Para monitorear posibles transiciones conformacionales de PMCA asociadas a la activación inducida por fosfolípidos descrita en la sección anterior, exploramos globalmente su estructura utilizando diferentes técnicas espectroscópicas.

La estructura secundaria de las proteínas puede ser explorada utilizando la técnica de dicroísmo circular en el UV lejano. La figura 8.1A muestra como la PMCA libre de fosfolípidos tiene un espectro característico de una proteína de membrana con predominio de estructura de alfa-hélice (Ladokhin y col., 2010). El agregado de DPPC no produjo cambios significativos lo que sugiere que la activación por fosfolípidos no produce grandes cambios en la estructura secundaria de la proteína.

Para obtener información sobre el estado de las regiones hidrofóbicas de la proteína utilizamos dos sondas fluorescentes: los residuos triptófano intrínsecos de la proteína y la sonda extrínseca 1-anilino-8-naftalensulfonato (ANS). Los residuos triptófano en proteínas de membrana se encuentran preferencialmente en la interfase agua/membrana, lo que permite detectar cambios en la estructura terciaria de la proteína que afecten esta región. El espectro de fluorescencia de la PMCA sin lípidos se encuentra centrado alrededor de 335 nm tal como se espera para proteínas de membrana plegadas (Kozachkov y Padan, 2011) y no presentó cambios significativos después del agregado de DPPC (fig 8.1B).

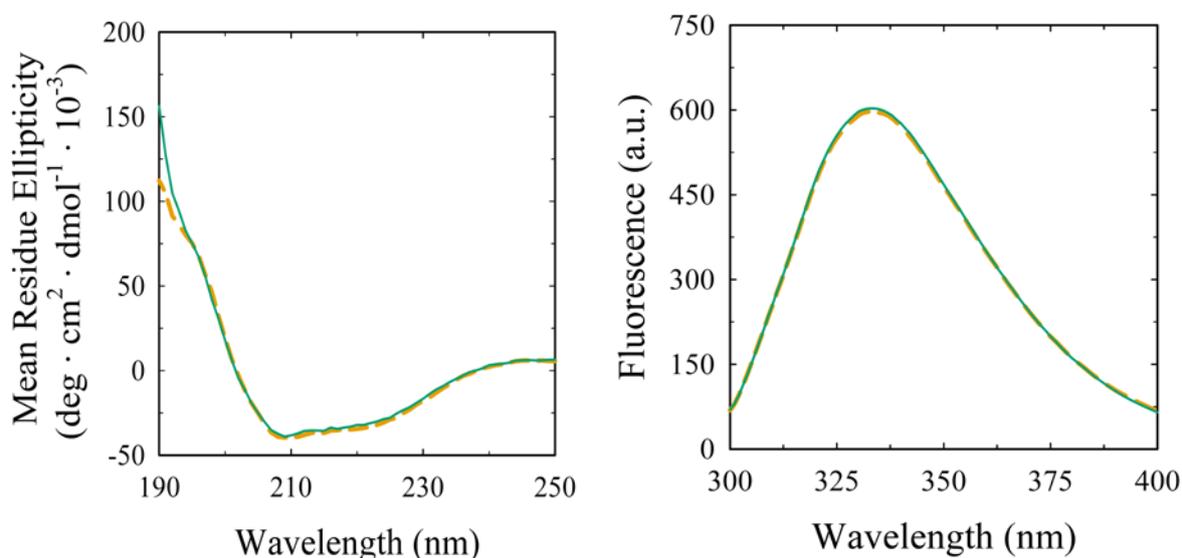


Figura 8.1: Espectros de dicroísmo circular (A) y espectros de fluorescencia intrínseca de triptofanos de PMCA (B). Línea sólida: espectro de PMCA en micelas de C₁₂E₁₀. Línea quebrada: espectro de PMCA tras el agregado de DPPC hasta una X_{FL}= 0.3 que produce máxima activación.

Esto indicaría que no se producen cambios importantes en el dominio transmembrana después del agregado de fosfolípidos.

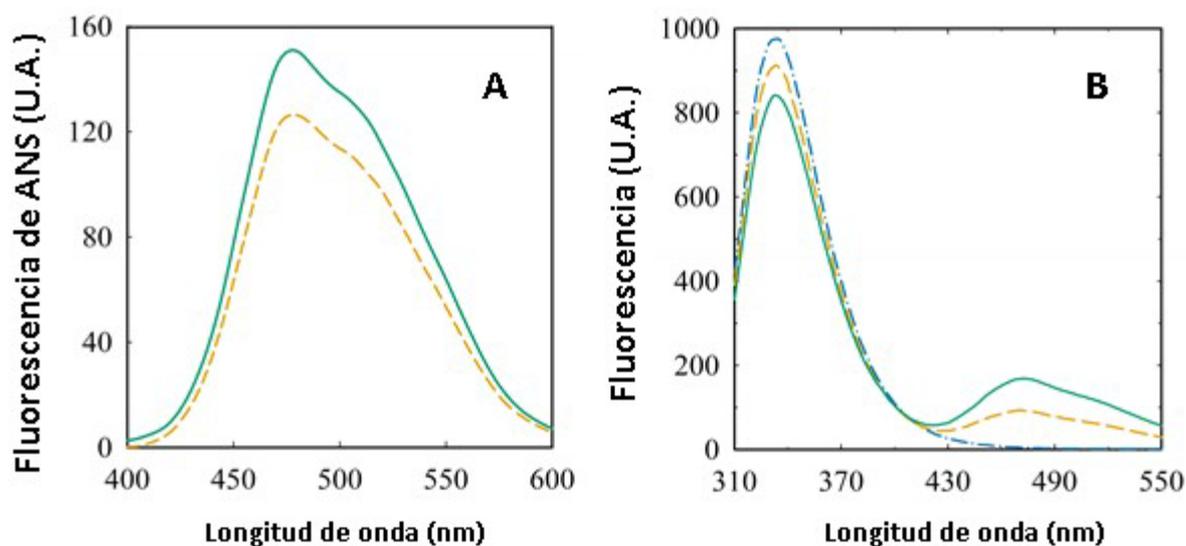


Figura 8.2: Espectros de fluorescencia de ANS (A) y del FRET entre PMCA y ANS (B). Línea azul punto y raya representa el espectro de fluorescencia de PMCA sin ANS. Línea a rayas marrón PMCA con ANS y línea llena verde PMCA con fosfolípidos

El agregado de DPPC hasta una fracción molar de 0.3 que produce la máxima activación produce un aumento específico en la fluorescencia de ANS.(A). El agregado de fosfolípidos produce un incremento en la energía transferida desde los triptofanos de PMCA al ANS, lo que indicaría una conformación más compacta de los segmentos transmembrana.

8.3 Discusión

En capítulos anteriores mostramos como la composición del sistema micelar tanto en proporción de fosfolípidos como en la identidad de la especie lipídica modula la actividad de un complejo transportador iónico de membrana como es PMCA. Analizamos también algunos factores biofísicos del sistema micelar que pueden dar cuenta de los fenómenos de caída de actividad a fracciones molares altas de fosfolípidos.

En este capítulo el énfasis fue puesto en cambios conformacionales en la proteína que pueden estar asociados a su activación. Se pudo observar que estos cambios son a nivel de la estructura terciaria y en particular se pudieron detectar fenómenos apreciables con ANS, una sonda que permite estudiar mediante espectroscopía de fluorescencia las regiones hidrofóbicas de PMCA. Si bien, estos cambios resultaron sutiles, sugieren un mayor empaquetamiento del dominio transmembrana de la PMCA tras la activación. Esto último coincide con estudios previos en nuestro laboratorio utilizando una molécula de fosfatidilcolina fotoactivable [¹²⁵I]TID-PC/16, donde demostramos que todos los tratamientos activadores de la PMCA llevan a una estructura del dominio transmembrana más compacta (Mangialavori y col; 2009;

2011). Una ventaja adicional de estos resultados es que permite de algún modo validar el supuesto de que las estructuras cristalográficas de proteínas de membrana, que rara vez son cristalizadas en membranas nativas, si no que suelen ser cristalizadas en mezclas con detergentes; no presentarían cambios estructurales y conformacionales grandes respecto de lo que son las conformaciones activas en entorno fosfolipídico o de micelas mixtas.

DISCUSIÓN GENERAL

9.1. Modelo de activación de la PMCA por fosfolípidos: Alcances y limitaciones

En el capítulo 6, se aplicó el modelo previamente propuesto (capítulo 5) en los datos provenientes de las medidas de actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de X_{FL} crecientes de los distintos fosfolípidos ensayados. Pudimos determinar los parámetros A_0 , A_1 , $X_{0.5}$ y C_x para todos los sistemas fosfolípido-detergente ensayados, los errores obtenidos fueron razonables (menores al 10%) para la mayoría de los parámetros (a excepción de A_0 , por razones explicitadas previamente). Sin embargo, el modelo mínimo fue adecuado para predecir el comportamiento de todos los fosfolípidos ensayados en el rango de X_{FL} de 0 a 0.3, es decir, hasta la zona de máxima activación por fosfolípidos. La única excepción fue el sistema compuesto por $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DLPC, para el cual, el modelo predijo el comportamiento observado, en todo el rango de fracciones molares ensayadas. El modelo propuesto por DodesTraian y col. (2012) no predice el comportamiento inhibitorio observado a fracciones molares de fosfolípidos mayores a 0.3. Si bien hubiese sido posible agregar un término a la ecuación que describiera la caída de la curva, son necesarios más experimentos para darle una explicación con un marco biofísico a la caída.

9.2. Relación entre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA y los cambios físicos que atraviesa el sistema fosfolípido-detergente

Lee (2004) ha propuesto que la actividad de las proteínas integrales de membrana es generalmente afectada por los lípidos del entorno. Utilizando la bomba de calcio del retículo sarcoplasmático (SERCA) como modelo, estudió el efecto de la reconstitución de esta proteína reconstituida en bicapas de distintos fosfolípidos variando el largo de cadena y el grado de insaturación. Una de sus conclusiones más importantes fue que el ancho hidrofóbico de la bicapa, definido por los largos de las cadenas carbonadas de los fosfolípidos es un parámetro muy importante para entender el efecto que se observa sobre las proteínas de membrana.

Los resultados obtenidos en el capítulo 6, demuestran que la actividad de la bomba de calcio de membrana plasmática (PMCA) es modificada por el largo de cadena del fosfolípido utilizado para su reconstitución (en sistemas fosfolípido-detergente), alcanzando un valor de actividad máxima ($X_{\text{FL}}=0.2$) en presencia de DMPC. Además, demostramos que al reconstituir a la PMCA en sistemas fosfolípidos insaturados-detergente, las actividades máximas alcanzadas fueron menores con respecto a las alcanzadas con fosfolípidos saturados. El sistema utilizado para la reconstitución de la PMCA, es diferente al de los estudios realizados en la SERCA por Lee y col. (2003), debido a la presencia de detergente, por lo tanto podríamos pensar que las premisas previamente citadas, con respecto al largo de cadena, no serían del todo válidas. Sin embargo, las estructuras cristalográficas de las proteínas de membrana, han sido adquiridas siempre en presencia de detergentes y en ausencia de lípidos. Además, resulta interesante investigar que diferencias se pueden obtener a nivel de la caracterización de proteínas de membrana en sistemas fosfolipídicos que presentan

características biofísicas diferentes: como ser la diferente exposición del sitio activo a sus sustratos, diferente presión lateral que puede alterar el equilibrio entre distintas conformaciones de PMCA y la presencia de una especie química foránea como es el detergente entre otras. La complejidad del estudio de las proteínas de membrana, radica en que son sistemas que se estabilizan en un sistema formado por un solvente acuoso y una matriz de anfifilos que no es en absoluto un soporte inerte, sino que presenta peculiaridades químicas y biofísicas cuyos efectos sobre la actividad de las proteínas se van dilucidando lentamente

Este trabajo constituye uno de los primeros estudios que relaciona el sistema de reconstitución de la PMCA desde un enfoque biofísico con su actividad catalítica, contribuyendo a encontrar la relación que existe entre la estructura del dominio hidrofóbico de la bomba y su función.

9.3. Relación entre la estructura de la PMCA y los fosfolípidos del entorno

En el capítulo 8 pudimos apreciar que los cambios inducidos por el agregado de fosfolípidos a nivel de la estructura secundaria y terciaria de PMCA son muy sutiles. La sonda que mayores efectos reportó fue ANS, lo que da a entender que en su estado activado, los segmentos transmembrana de la proteína se encuentran en una conformación más compacta que permite por un lado una mayor fluorescencia de ANS al encontrarse en un entorno más hidrofóbico, y por otro lado mayor FRET al posicionarse la sonda en una posición más cercana a los triptofános de la región transmembrana.

Es interesante mencionar que gran parte de las relativamente escasas estructuras cristalográficas de proteínas de membrana, han sido obtenidas en presencia de detergentes (Toyoshima y col., 2000) y en ausencia de lípidos. Por lo tanto, una conclusión interesante tanto a nivel de la actividad enzimática como de la información estructural adquirida, es que las estructuras cristalográficas obtenidas son una buena representación de la estructura de la proteína tal y como se encontrará inserta en la membrana y en condiciones de activación. De este modo, gana validez el aceptar que la cristalización aún habiéndose efectuado en detergentes, arroja estructuras que pueden resultar de utilidad para análisis posteriores de biología computacional. Es decir, los detergentes pueden permitir un plegamiento y empaquetamiento adecuado de las hélices transmembrana y una posterior reversibilidad en la activación enzimática tras el agregado de fosfolípidos

9.4. Perspectivas

-
- Apuntaremos a completar el modelo propuesto por DodesTraian y col. (2012), con el objetivo de contar con un nuevo término que describa en su totalidad el comportamiento de la actividad Ca^{2+} -ATPasa observado en todo el rango de fracciones molares ensayadas.
- Se ensayará la incorporación de la PMCA en liposomas formados por distintos fosfolípidos. Se establecerán comparaciones entre las actividades obtenidas en este nuevo sistema, con respecto a las obtenidas para los sistemas de micelas mixtas. Además, se repetirá el experimento con la incorporación de ionóforo de Ca^{2+} al medio (Capítulo 7) para probar nuevamente la hipótesis planteada en ese capítulo.

- Se realizarán nuevos experimentos con la técnica de FCS (Espectroscopia de correlación de fluorescencia) para monitorear la transición reversa a la previamente estudiada (capítulo 7), es decir, se partirá desde liposomas y se agregará detergente hasta alcanzar la solubilización total de los mismos.
- Se desea realizar la determinación de las $K_{ex,FL}$ (DodesTraian 2012), para la mayoría de los fosfolípidos previamente ensayados.

BIBLIOGRAFIA

- Adamo HP, Rega AF, 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, 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
- Almog S, Kushnir T, Nir S, Lichtenberg D. (1986)** Kinetic and structural aspects of reconstitution of phosphatidylcholine vesicles by dilution of phosphatidylcholine-sodium cholate mixed micelles. *Biochemistry*25:2597-605.
- Andree HA, Reutelingsperger CPM, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM.**(1990) Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipids bilayers. *J Biol Chem.* 265: 4923-4928
- 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.* 155:26-7
- Bers DM.** (1982). A simple method for the accurate determination of free $[Ca^{2+}]$ in Ca^{2+} -EGTA solutions. *Am. J. Physiol.* 242:404-8.
- Blackwood RA, Ernst JD** (1990). Characterization of calcium dependent phospholipid binding, vesicle aggregation, and membrane fusion by annexins. *Biochem. Journal.* 266: 195-200.
- Borchman D, Simon R, Bicknell-Brown E.** (1982) Variation in the lipid composition of rabbit muscle sarcoplasmic reticulum membrane with muscle type. *J Biol Chem.* 257:14136-9.
- Brodin P, Falchetto R, Vorherr T, 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
- 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.
- Chen PS, Toribara TY and Warner H.** (1956). Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 28:1756-8
- Cheug WY.** (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 4;207(4426): 19-27.
- 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.
- Creighton.** (1993). Proteins. Structures and molecular properties. W.H- *Freeman and Company, New York.*
- Daniel E and Weber G.** (1966) Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphthalene-sulfonate. Fluorimetric titrations. *Biochemistry.* 6:1893-900.
- de la Maza A, Parra JL.** (1996) Changes in phosphatidylcholine liposomes caused by a mixture of Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate. *Biochim. Biophys. Acta.* 1300:125-34.

- de Tezanos Pinto F, 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
- Dodes Traian MM, Cattoni DI, Levi V, González Flecha FL.**(2012) A two-stage model for lipid modulation of the activity of integral membrane proteins. *PLoS One.* 6:e39255. doi: 10.1371/journal.pone.0039255
- Engelman DM, Chen Y, Chin CN, Curran AR, Dixon AM, Dupuy AD, Lee AS, Lehnert U, Matthews EE, Reshetnyak YK, Senes A, Popot JL.** (2003) Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett.*555:122-5.
- Enyedi A, Flura M, Sarkadi B, Gardos G, Carafoli E.**(1987) The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J Biol Chem.* 262:6425-30.
- Falchetto R, Vorherr T, Carafoli E.** (1992) The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci.* 12:1613-21.
- Filomatori CV, Rega AF.** (2003) On the mechanism of activation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by ATP and acidic phospholipids. *J Biol Chem.* 278:22265-71.
- Filoteo AG, Gorski JP, Penniston JT.** (1987) The ATP-binding site of the erythrocyte membrane Ca^{2+} pump. Amino acid sequence of the fluorescein isothiocyanate-reactive region. *J Biol Chem.* 262:6526-30.
- Filoteo AG, Enyedi A, Penniston JT.** (1992) The lipid-binding peptide from the plasma membrane Ca^{2+} pump binds calmodulin, and the primary calmodulin-binding domain interacts with lipid. *J Biol Chem.*267:11800-5.
- Fiske, C.H. & Subbarow Y.** (1925) The colorimetric determination of phosphorous. *J Biol Chem.* 179: 66-71
- Garcia ME, Del Zotto H, Caride AJ, Filoteo AG, Penniston JT, Rossi JP, 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.** (1978). Activation of partial reactions of the Ca^{2+} -ATPase from human red cells by Mg^{2+} and ATP. *Biochim. Biophys. Acta.* 513:59-65.
- Gennis RB.** (1989) Biomembranes. Molecular structure and function. *Springer-Verlag, New York.*
- 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
- Guerini D, Coletto L, Carafoli E.**(2005) Exporting calcium from cells. *Cell Calcium.* 38:281-9.
- Hao L, Rigaud JL, Inesi G.**(1994) $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and exogenous lipids. *J Biol Chem.* 269:14268-75.
- James P, Maeda M, Fischer R, Verma AK, Krebs J, Penniston JT, 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.
- James P, Zvaritch EI, Shakhparonov MI, Penniston JT, Carafoli E.** (1987) The amino acid sequence of the phosphorylation domain of the erythrocyte Ca^{2+} ATPase. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 149:7-12.
- Kozachkov L, Padan E.** (2011) Site-directed tryptophan fluorescence reveals two essential conformational changes in the $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter NhaA. *Proc Natl Acad Sci*108: 15769-74
- Ladokhin AS, Fernández-Vidal M, White SH.** (2010) CD spectroscopy of peptides and proteins bound to large unilamellar vesicles. *J Membr Biol.* 236:247-53
- Le Maire M, Kwee S, Andersen JP, Møller JV.** (1983). Mode of interaction of polyoxyethyleneglycol detergents with membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 129:525-32.
- Lee AG.** (1998) How lipids interact with an intrinsic membrane protein: the case of the calcium pump. *Biochim. Biophys. Acta.* 376:381-90.
- Lee AG** (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*1666:62-87
- Lee AG.** (2011) Lipid-protein interactions. *Biochem Soc Trans.*39:761-6
- Levine** (1991) Fisicoquímica. *Mc Graw-Hill, Madrid*
- Levy D, Gulic A, Seigneuret M, Rigaud JL.** (1990) Phospholipids vesicle solubilization and reconstitution by detergents. Symmetrical analysis of two processes using octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether. *Biochemistry* 29:9480-8.
- Levi V, Rossi JP, Castello PR, González Flecha FL** (2003) Quantitative analysis of membrane protein-amphiphile interactions using resonance energy transfer. *Anal Biochem* 317: 171–179.
- Lichtenberg D, Robson RJ, Dennis EA.** (1983) Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochim. Biophys. Acta.* 737:285-304.

- Mangialavori IC, Giraldo AM, Buslje CM, Gomes MF, Caride AJ, Rossi JP.** (2009) A new conformation in sarcoplasmic reticulum calcium pump and plasma membrane Ca²⁺ pumps revealed by a photoactivatable phospholipidic probe. *J Biol Chem.* 284:4823-8
- Mangialavori I, Villamil-Giraldo AM, Pignataro MF, Ferreira-Gomes M, Caride AJ, 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
- Møller y le Maire (1993) Moller JV, le Maire M.(1993). Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *J Biol Chem.* 268:18659-72.
- Møller JV, Juul B, le Maire M.** (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta.*1286:1-51.
- Moroi I.** (1992) Micelles. Theoretical and applied aspects. *Plenum Press, New York.*
- Niggli V, Adunyah ES, Penniston JT, Carafoli E.** (1981) Purified (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospho-lipids. *J Biol Chem.* 256:395-401
- Oliveira VH, Nascimento KS, Freire MM, Moreira OC, Scofano HM, Barrabin H, Mignaco JA.**(2008) Mechanism of modulation of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase by arachidonic acid.*Prostaglandins Other Lipid Mediat.*; 87:47-53.
- Ollivion M, Eidelman O, Blumenthal R, Walter A.** (1988) Micelle-vesicle transition of egg phosphatidyl-choline and octylglucoside.*Biochemistry* 27:1695-703.
- Pfeiffer DR, Reed PW, Lardy HA.** (1974) Ultraviolet and fluorescent spectral properties of the divalent cation ionophore A23187 and its metal ion complexes. *J Biol Chem.*13(19): 4007-14
- Paternostre MT, Roux M, Rigaud JL.** (1988) Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry*27:2668-77.
- Popot JL and Engelman DM.** (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* 29:4031-7.
- Pressman BC,** (1976) *Annu Rev Biochem* 45:501
- Raynal P, Pollard HB.**(1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins.*Biochim Biophys Acta.* 1197: 63-93
- Rega AF and Garrahan PJ.** (1986) The Ca²⁺ pump of plasma membranes. *CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida.*
- Rigaud JL, Pitard B, Levy D.** (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*1231:223-46.
- Rinaldi DE and Adamo HP.** (2009). The role of the Ca²⁺ binding ligand Asn879 in the function of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:2404-10.
- Robinson NC, Tanford C.** (1975). The binding of deoxycholate, Triton X-100, sodium dodecyl sulfate, and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b5. *Biochemistry.* 14:369-78
- Roman EA, Faraj SE, Gallo M, Salvay AG, Ferreira DU, Santos J.**(2012) Protein stability and dynamics modulation: the case of human frataxin. *PLoS One.*7:e45743
- Rossi y Schatzmann, 1982 Rossi JP, Schatzmann HJ.** (1982) Is the red cell calcium pump electrogenic? *J Physiol.* 327:1-15
- Roufogalis BD and Villalobo A** (1989). The Purified (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase. Purification and reconstitution. The red cell membrane, a model for solute transport. *Humana Press. NJ,* pp 76-83
- Sarkadi B, Enyedi A, Gárdos G** (1989). Conformational changes of the in situ red cell membrane calcium pump affect its proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 899:129-33.
- Seddon AM, Curnow P, Booth PJ.** (2004) Membrane proteins, lipids and **detergents**: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta*1666:105-17.
- Silvius JR.** (1992) Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 21:323-48.
- Strehler EE, James P, Fischer R, Heim R, Vorherr T, Filoteo AG, Penniston JT, 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.
- Strehler EE, Zacharias DA.** (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.* 81:21-50.

- Swairjo MA, Concha NO, Kaetzel MA, Dedman JR, Seaton BA** (1995) Ca⁽²⁺⁾-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Biol.* 2:968-74.
- Sweadner KJ, Donnet C.** (2001) Structural similarities of Na⁺,K⁺-ATPase and SERCA, the Ca⁽²⁺⁾-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J.* 356:685-704.
- Tanford C.** (1980). The hydrophobic effect: Formation of micelles an biological membranes. *Wiley-Interscience, New York.*
- Toyoshima C, Nakasako M, Nombra H, Ogawa H.** (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature.* 405. 647-55.
- Villamil Giraldo AM, Castello PR, González Flecha FL, Moeller JV, Delfino JM, Rossi JP.** (2006) Stoichiometry of lipid-protein interaction assessed by hydro-phobic photolabeling. *FEBS Lett.* 580: 607-12.
- Vinsón PK, Talmon Y, Walter A.** (1989) Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl transmission electron microscopy. *Biophys. J.* 56:669-81
- Volwerk JJ, Mrsny RJ, Patapoff TW, Jost PC, Griffith OH.** (1987) Multiple equilibria binding treatment of lipid and detergent interactions with membrane proteins. Application to cytochrome c oxidase solubilized in cholate. *Biochemistry* 26:466-75.
- Wallin E, von Heijne G.** (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean and eukaryotic organisms, *Protein Sci.* 7 1029-1038.
- Wang KK, Wright LC, Machan CL, Allen BG, Conigrave AD, Roufogalis BD.** (1991). Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase from human erythro-cytes. *J Biol Chem.* 266: 9078-85.

ACADÉMICO EMÉRITO DR. HÉCTOR MARTIN CHECHILE

El Dr. Chechile fue un hombre sabio, no fue un genio, pero supo tener su mente abierta, respetando al prójimo, escuchándolo, sobresaliendo sin vanagloriarse, humilde e íntegro, y como todo hombre sabio, ni siquiera supo que era sabio...

Ligado desde su juventud a la hoy Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, donde se recibió de Doctor en Farmacia y Bioquímica y donde ejerció hasta su jubilación todos los cargos de la carrera docente, culminándola como Profesor Titular, siempre en la misma especialidad, la Farmacotecnia.

El no poseer un cargo con mayor dedicación a la investigación, no fue obstáculo para realizar investigaciones científicas relacionadas con desarrollos farmacotécnicos, en especial formas farmacéuticas esferoidales conteniendo distintos principios activos, estudiando las características reológicas de variados excipientes, comportamientos de disolución, estabilidad, etc.

Se involucró en la gestión académica, participando activamente en la Comisión de Enseñanza de la Facultad, en el gobierno del Departamento de Ciencias Biológicas, de quien depende la Carrera de Farmacia, como Consejero Departamental, hasta ocupar el cargo de Jefe de dicho Departamento. Asimismo fue Consejero del entonces Consejo Académico de la Facultad y representante de la Facultad en el Ente Coordinador de Unidades Académicas de Farmacia y Bioquímica (ECUAFyB)

Paralelamente se dedicó a la profesión farmacéutica en el ámbito hospitalario llegando a ser Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital Interzonal General de Agudos General San Martín de La Plata. Desde este lugar realizó propuestas para propender a la realización de un ejercicio de la Farmacia Clínica en el ámbito privado, cuando todavía no se incluían estos temas en los planes de estudio de la Carrera de Farmacia.

A su vez se dedicó a la confección de un Vademécum mínimo, indispensable y renovable de monodrogas para toda la provincia de Buenos Aires a nivel Hospitalario, así como a la de un Vademécum mínimo Ambulatorio en Pediatría y a Normas para el funcionamiento de una farmacia hospitalaria.

Totalmente identificado con la profesión farmacéutica, colaboró entusiastamente con el Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires, siendo Miembro de la Comisión Científica, de Educación Permanente y de Créditos de dicho Colegio, representándolo en la Comisión Permanente de Carrera Médico Hospitalaria de la Provincia de Buenos Aires. Secretario de Redacción de Revista Bifase y Arbitro de la Revista Acta Farmacéutica Bonaerense, editadas por el mismo Colegio de Farmacéuticos.

Presidente de la Federación de Profesionales Universitarios de la Provincia de Buenos Aires, participó presidiendo, disertando y formando parte de Comités Científicos de numerosos Congresos de la especialidad. Fue Miembro de la Junta de Notables de la Confederación Farmacéutica Sudamericana para la Redacción de su documento fundacional.

Ingresó en nuestra Academia en el año 1990, como Académico Titular y en el año 2007, fue reconocida su trayectoria como Académico Emérito, en el 2009.

En 1988 recibió el Premio a la Trayectoria Profesional y en 2011 la Honorable Cámara de Senadores de la Provincia de Buenos Aires le otorgó un reconocimiento al Mérito por su labor profesional.

En lo personal siempre lo voy a recordar y le voy a estar agradecida ya que fue mi profesor y en su calidad de Co-director de mi tesis doctoral supo estar siempre presente con su sabiduría y experiencia.

In memoriam

Le escuché decir que el mejor premio que podría recibir era que sus ex alumnos al cruzarse con él, luego del paso de los años, lo reconocieran como profesor y se acercaran a saludarlo con la estima y el agradecimiento que hacia él podrían tener, por su rol de docente. Y así considero que lo vamos a recordar.

Acad. María Guillermina Volonté

SEMBLANZA DEL ACADÉMICO HUGO GUILLERMO PEREZ

Es muy dificultoso resumir en pocas líneas la semblanza de una persona querida dotada de talentos profesionales y morales. Tarea que se vuelve más ardua cuando la persona en cuestión había sido presentado a la Academia por mí.

A pesar de esta dificultad, he aceptado con gusto la amable sugerencia que se me hiciera para escribir este breve e incompleto texto, ya que se trataba no sólo de un colega sino de un gran amigo que muy lamentablemente nos hemos enterado de su desaparición muy tarde, pues falleció en el 2012, desconociendo la Academia ese hecho.

Si bien el Dr. Pérez ingresó como Académico de número, su labor profesional así como la distancia de su domicilio (Luján) no le permitió continuar en esa categoría, solicitando su transferencia a la categoría de Académico Correspondiente.

El Dr. Hugo Pérez nació en Luján, el 16-2-1932 graduándose como Farmacéutico en 1955 y Dr. En Farmacia en 1958, en la Universidad de Buenos Aires.

Su incorporación a la Academia se realizó el 23 de octubre de 1997, su disertación versó sobre “La evolución de la ciencia y tecnología lechera en la Argentina”, en esta especialidad dedicó toda su vida académica y profesional.

En la docencia actuó como Profesor Adjunto de Microbiología en la Universidad Nacional de Luján (1976) y como Profesor Adjunto de Microbiología de Alimentos en la UBA, (1980) dictó numerosos cursos sobre Microbiología de Productos Lácteos en diversas Instituciones como ser UBA, CEPANZO, CITIL-INTA,(1978/9) Municipalidad de la Ciudad de Buenos Aires (1980), participó asimismo como Profesor Invitado en la Universidad de Morón, Universidad Nacional de La Plata, sobre temas de la industria lechera; Servicio de Nutrición del Hospital de Gastroenterología Bonorino Udaondo, conferenciando sobre los procesos en la industria láctea su efecto sobre los nutrientes (1983) y otros cursos y conferencias sobre la temática láctea.

También participó en numerosas Jornadas y Congresos nacionales e internacionales realizando trabajos asentados en diversas publicaciones nacionales.

Desde 1981 participó como miembro del Código Alimentario Argentino en la regulación de productos lácteos.

Su actuación profesional la realizó a full, iniciándose en 1962 en CAPROL S.A., como Jefe de Laboratorio de Usina láctea, quedándose como Asesor técnico en esa empresa ya que pasó a la Usina láctea La Serenísima de Mastellone Hnos. como Jefe de Laboratorio primero y luego como Director Técnico, donde ejerció su intensa actividad participando con esta Empresa y ayudando a la misma en un principio con el apoyo de nuestra cátedra de Higiene de la Facultad de Farmacia y Bioquímica en el mejoramiento de la calidad sanitaria de la leche. Puede decirse que dicha Empresa con el aporte del Dr. Pérez es líder en Argentina, contribuyendo a estrictos parámetros de trabajo en todas las etapas de elaboración partiendo de la recolección de la materia prima, asimismo participó en la capacitación permanente del personal para la mejora sanitaria de los productos lácteos.

Por último no se puede dejar de mencionar su trayectoria sana como persona, esposo y padre de familia siendo generoso, afable y con gran sentido de humor, ejemplo de una vida coherente.

Si bien la noticia fue tardía y sorpresiva, amigo, recuerda que nuestra meta es partir y que allí no existe el tiempo y espacio por lo que no diré adiós, sino hasta pronto en el día que nos veamos de nuevo en la gloria del Señor.

Acad. Miguel D'Aquino

SEMBLANZA ACADEMICO ANTONIO FRANCISCO SOMAINI

Nació el 20 de octubre de 1913, en un pequeño pueblo del noroeste de la provincia de Buenos Aires llamado Carlos Tejedor. Por cuestiones familiares se fue trasladando junto a sus padres por diferentes provincias de nuestro país donde vivieron las realidades propias de cada región.

En 1936 se graduó como farmacéutico, y en estas instancias, empezó a desarrollar su profesión y a actuar en política en la Provincia de Tucumán.

Durante varios años se desempeñó como director técnico de reconocidos laboratorios farmacéuticos.

Entre sus múltiples actividades fue fundador de la Comisión Nacional de Medicamentos (Conamed); desempeñó cargos relacionados con su actividad en las provincias de Corrientes y Tucumán; fue presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de Capital Federal; integró la Comisión para la Investigación de ilícitos en la Aprobación de Medicamentos, miembro de la Comisión permanente del Consejo Asesor del Ministerio de Salud y Acción Social y secretario de la Comisión que elabora el Formulario Terapéutico Nacional.

Es nombrado Académico Titular de esta Academia a fines de 1980 y como Académico Emérito en 2004

Ha sido un activo protagonista de la conformación del sistema de salud de la Provincia de Santa Fé. En agosto de 2008, entonces gobernador Hermes Binner, firmó el decreto que lo declara Huésped de Honor, señalando que además de aportar sus conocimientos para elaborar el Formulario Terapéutico Provincial, Somaini desarrolló una importante labor en pos de democratizar el acceso público de los medicamentos.

En diciembre de 2010, recibe el título de “*Doctor Honoris Causa*”, distinción otorgada por la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

Durante un período de más de dos décadas como dirigente del Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal, el Dr. Antonio Somaini llevó adelante numerosas acciones en pos de la inclusión de los profesionales farmacéuticos en su rol de agentes de salud.

En el año 2001 la Confederación General de Profesionales de la República Argentina le otorga el Premio a la Trayectoria Profesional, el cual fuera entregado a destacadas personalidades como Ernesto Sábató, Eugenia Sacerdote de Lustig, Héctor Polino y el bioquímico Oscar Fay.

En 1997 el Dr. Antonio Francisco Somaini es honrado por la Cámara de Diputados de la Nación como Ciudadano Notable, y por el Consejo Deliberante como Ciudadano Ilustre de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Ha tenido un fuerte compromiso apoyando la gestión del Dr. Ginés González García, con respecto a la creación de la Ley de Medicamentos Genéricos que fuera aprobada el 28 de agosto de 2002.

Además, continuó su actividad en el movimiento profesional en la Confederación Farmacéutica, en el Colegio de Farmacéuticos y en el Partido Socialista simultáneamente. Junto a su gran amigo el entonces diputado nacional Héctor Polino, logran por la ley 24.834 de 1997 que nuestra entonces Academia Argentina de Farmacia y Bioquímica sea declarada Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

Antonio Somaini ha sido un gran profesional farmacéutico, hombre de palabra y de honor, que practicaba el concepto de lealtad, virtudes hoy que son verdaderas rarezas en la sociedad actual. De sentimiento profundo y pensamiento libre, que vivió y trasladó su amor a la vida con gran conocimiento y sabiduría a todos los que hemos tenido el privilegio de conocerlo y compartir gratos momentos en su prolífica vida.

In memoriam

Era una persona querible, entrañable, sensible y amigo de sus amigos.

Silencioso a veces, con voz potente y enérgica otras, siguió siempre fiel a sus nobles principios, sin modificar sus pensamientos y colaborando con exquisitez con todos quienes necesitaron de su conocimiento. Fallece en la ciudad de Buenos Aires, el 26 de diciembre de 2013.

Nunca mejor que en este caso, las inolvidables palabras de su amigo y colega el profesor Francisco Cignoli, que decía: “El que no conoce la historia de su propia ciencia, no sabe ubicarla en el tiempo, no puede aperebirse de las etapas de su progreso, y es injusto con los hombres que le dieron vida y prestigio”. Y la huella de Don Antonio que dio vida y prestigio a nuestra profesión, ha quedado en muchos corazones que siguen compartiendo el legado máspreciado: su pasión por la vida, la verdad, el amor y la honestidad.

Por todo esto nuestro humilde homenaje y su recuerdo imborrable en todos nosotros para siempre.-

Acad. Carlos Bregni