QuímicaViva
ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Buenos Aires 17 de agosto 2009

## **Dr. Ernesto Jorge Massouh** - 1945-2009

Cuesta escribir cuando un amigo nos abandona. Cuesta porque aunque su recuerdo nos acompañará para siempre, quisiéramos volver a compartir los almuerzos como lo hicimos durante tantos años.

Hace muy poco que perdimos al compañero, al profesor, al colega. Fueron casi 30 años de convivencia en los que el área de Microbiología del Departamento de Química Biológica nos aglutinó en los días de festejos por premios, subsidios, presentaciones de tesinas y tesis de nuestros discípulos. Pero también en épocas pasadas en las que tuvimos que afrontar serias dificultades.

Conocí a Ernesto Massouh como alumno, en el año 1971 le tomé examen de Microbiología e Inmunología dado que como profesora de Virología del entonces Centro de Investigaciones Microbiológicas, formaba parte de la mesa examinadora. Poco tiempo después se presentó a concurso para un cargo de ayudante frente a todos los profesores del área que éramos cinco. Impactó su presentación sobre la estructura de las inmunoglobulinas de modo que fue seleccionado y pasó a formar parte del plantel docente de la materia Inmunoquímica cuya profesora era la Dra Ana María Brunengo. Materia de la que era responsable en la actualidad.

Ernesto Massouh amaba la docencia, sus clases se destacaban por la claridad, como profesor se brindaba a los alumnos ante cualquier requerimiento e invitaba a profesores expertos a participar en algunos de los temas de actualidad de la Inmunología. Participó regularmente como docente de las materias Inmunoquímica, Microbiología e Inmunología y Microbiología General e Industrial y varios cursos de posgrado sobre Inmunología.

Aceptaba participar con entusiasmo como jurado de tesis y se puede decir que no era una tarea que le pesaba. Se destacó también por su colaboración desinteresada en las tareas administrativas y académicas del Departamento de Química Biológica, de esta manera logró relacionarse con todos los integrantes docentes y no docentes del mismo.

Gran entusiasta del cine y del teatro, nos transmitía su entusiamo durante los almuerzos de modo que la mayoría de nosotros tratábamos de coincidir en el horario en que él estaba presente.

Hemos perdido a un amigo, al decir de algunos un hermano. Sea entonces este homenaje de los que editamos QuímicaViva en la que colaboró como autor y juez.

Dra. Celia E.Coto

QuímicaViva
ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

# Virus sin fronteras: el caso del virus cow pox, agente de la viruela bovina.

**por Celia E.Coto***

La pandemia de gripe de este año 2009 es un claro ejemplo de que los virus no reconocen fronteras, no sólo las que limitan a los países sino también otras fronteras como la pobreza, la edad o la educación.

Las condiciones sanitarias en las que viven muchas personas, en especial los niños, derivan directamente del estado de pobreza familiar y en ese sentido las diferencias entre grandes poblaciones de Latinoamérica y los países europeos centrales son abismales. Mientras muchos niños de Latinoamérica viven descalzos, en casas paupérrimas, mal alimentados y rodeados de todo tipo de animales salvajes y de insectos; en países europeos como Alemania, Francia y Holanda los niños y adolescentes eligen mascotas para compartir sus vidas. No merecería nuestro comentario si se tratara de gatos o perros, es que esas mascotas de compañía son ratas. Estos animales muy populares en Estados Unidos y Europa son ratas derivadas de la especie *Rattus norvegicus* (rata noruega), cuyo origen se remonta a principios del siglo XX cuando algunas personas comenzaron a criarlas y cruzarlas de manera de obtener animales dóciles e inteligentes con los cuales entretenerse y sentirse acompañados en sus hogares. En cuanto a su aspecto el color del pelaje, varía desde blanco hasta azul (ver fotografía 1). Estas elegantes ratas viven más que sus congéneres salvajes por su mejor alimentación y salud y no son transmisores de enfermedades bacterianas propias de las ratas marrones (1). Sin embargo, tal como narraremos a continuación se están convirtiendo en una fuente de infección del virus cow pox para el hombre.

El virus del cow pox (CPXV) tiene una historia curiosa. Tal como lo relatáramos en trabajos anteriores (2,3) sirvió para que Edward Jenner, en 1796, creara su famosa vacuna contra la viruela vigente hasta 1980, año en que se acordó dejar de vacunar en el mundo debido a la desaparición de casos clínicos de la enfermedad.

***Fotografía 1. Típica rata de compañía de cabeza manchada en forma de caperuza. Fuente: wikipedia.org/wiki/fancy-rat.***

En el transcurso de su práctica médica, Jenner observó que los animales de granja, como vacas, caballos y cerdos sufrían enfermedades parecidas a la viruela que se conocían como Cowpox, Horsepox y Swinepox respectivamente y que dichas enfermedades podían transmitirse al hombre. Observó también que las ordeñadoras de vacas que sufrían de Cowpox desarrollaban unas pocas pústulas en sus manos a la vez que estaban protegidas contra la viruela, porque no enfermaban durante un brote epidémico.

Hoy sabemos, que esos virus, miembros de la familia *Poxviridae* pertenecientes a la subfamilia que infecta a los vertebrados (*Chordopoxvirinae*) y al género *Orthopoxvirus,* comparten antígenos comunes en su estructura, por lo que presentan inmunización o protección cruzada. Nos referimos específicamente a los virus de viruela, vaccinia (utilizada como vacuna), cowpox y monkey pox (viruela de los monos) ya que en el género se clasifican numerosas especies más sobre las que no discutiremos.

***Balance ecológico***

El origen del virus de vaccinia que se usó como vacuna es incierto. Mediante secuenciación de su genoma se ha logrado establecer que no se trata de una variante del virus viruela, ni es el primitivo cowpox utilizado por Jenner. Todas las cepas de vaccinia utilizadas tienen genomas similares por lo que se especula o bien que se trata de un recombinante del virus cowpox con otro virus del grupo o que se obtuvo después de tantos pasajes por los brazos de las personas. En la referencia (3) se discuten los eventuales peligros del uso del virus vaccinia como vacuna que finalmente llevaron a discontinuar la vacunación frente a la desaparición de casos de viruela.

Hace casi veinte años que se ha dejado de vacunar. ¿Qué ha ocurrido en este lapso con la presencia en la naturaleza de los otros orthopoxvirus relacionados? Por el momento se han detectado tres: el monkey pox (viruela de los monos), el virus vaccinia y el cowpox. El virus monkey pox es un virus zoonótico cuyo reservorio son roedores y en menor medida algunos primates no humanos. Es originario de África y aunque fue descubierto en 1958, los primeros

casos en el hombre se describieron en la década de los 70 (4). La zona de influencia del monkey pox se ha extendido y en Estados Unidos se han reportado brotes de esta virosis en el 2003. El peligro de la infección con los poxvirus reside en el aumento del número de personas inmunosuprimidas por medicación o infección con el virus HIV. En estas personas las infecciones con los virus pox son severas y de carácter generalizado.

Es curiosa la situación que sufre el ganado vacuno en Brasil: la infección con virus vaccinia. En este caso el contagio pasó del hombre al animal aunque no se tiene muy claro cuándo y cómo ocurrió. Lo que no existen dudas es que la infección con virus vaccinia se extiende por todo el terrritorio brasileño afectando a los animales en su calidad y también a la leche que producen. Los numerosos aislamientos de ortopoxvirus de humanos y vacunos ocurridos desde 1963 son todas cepas de la especie virus vaccinia (5).

El tercer ortopoxvirus que está causando preocupación es el virus cowpox cuyo reservorio son los ratones silvestres y no las vacas como se creyó durante muchos años. Es notable la capacidad de este virus de saltar las barreras de las especies enfermando a los huéspedes ocasionales, siendo uno de los factores importantes en la transmisión, las ratas marrones (*Rattis norvegicus*). Mientras el virus de vaccinia parece medrar en Latinoamérica, CPXV es endémico entre los roedores del continente europeo. Pero se ha manifestado clínicamente en diferentes huéspedes y casi con certeza por contacto con las ratas salvajes como se muestra en la figura.

Como todos estos virus pox causan enfermedades relativamente benignas lo que se preguntan los investigadores es si su presencia estaba enmascarada por la existencia de los casos de viruela o por efecto de la aplicación de la vacuna antivariólica dado que, como mencionamos antes, todos estos virus presentan inmunidad cruzada.

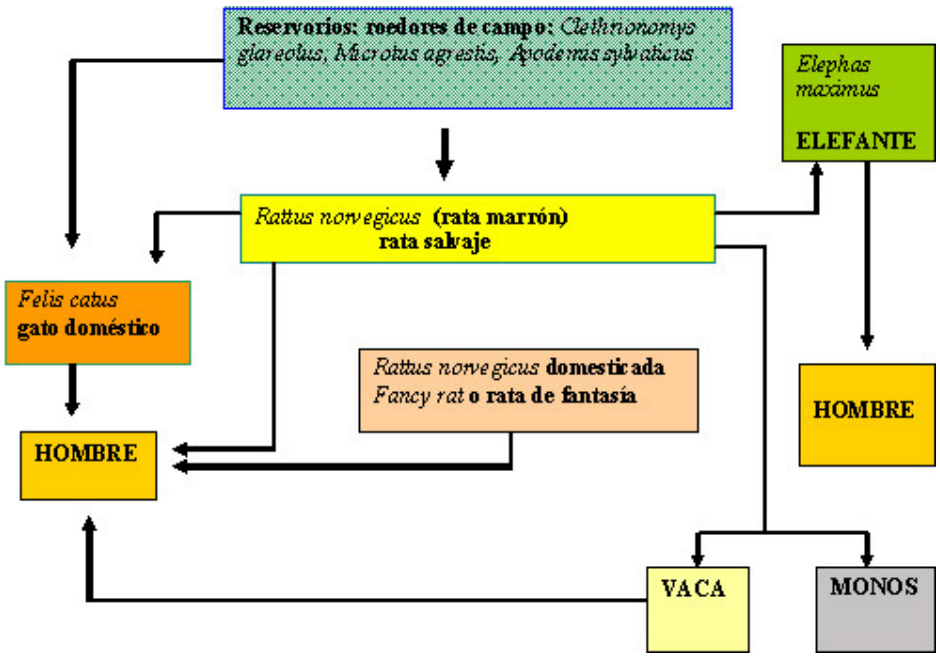

***Figura: Transmisión del virus cowpox****: los ratones de campo son aparentemente los reservorios del virus, no se sabe si también lo es la rata marrón. Según el esquema basado en las publicaciones científicas, el principal transmisor de la enfermedad sería Rattus norvegicus y los huéspedes accidentales, el gato doméstico, el elefante, las ratas de compañía, la vaca y diversas clases de monos. Salvo para estos últimos, se ha demostrado que el resto de los animales mencionados pueden infectar al hombre que sería también un huésped incidental. No se pudo probar que haya transmisión entre humanos.*

***Reservorios y transmisores***

Entre 1995 y 1999 se publicaron tres trabajos que demuestran mediante diferentes técnicas que los reservorios del CPXV en Europa Occidental son los ratones silvestres (6), (7), (8). Las especies involucradas son *Clethrionomys glareolus, Microtus agrestis*, *Apodemus sylvaticus* y también encontraron un aislamiento de virus en el ratón casero *Mus musculus*. Se cree que los gatos domésticos (ver figura) pueden entrar en contacto con estos roedores en ciertas épocas del año e infectarse y luego actuar de transmisores al humano (8). Los síntomas del gato son la aparición de lesiones en la cara, cuello, patas y menos frecuentemente infecciones del tracto respiratorio superior. ¡Pero ojo con el cowpox, porque hasta los elefantes de circo pueden infectarse! En febrero de 2007, un elefante (*Elephas maximus*) de un circo sito al Norte de Alemania apareció todo lleno de úlceras en la piel y membranas. No se pudo curar al animal que presentaba una infección generalizada por Cowpox y hubo que sacrificarlo. Se sabía que no había sido vacunado contra la viruela. Se secuenciaron dos genes del CPXV y se caracterizaron. A los pocos días su cuidador desarrolló una pústula en una mano. El análisis de la lesión permitió aislar y caracterizar genéticamente un virus igual al del elefante. Con el fin de averiguar cuál había sido el transmisor se capturaron cuatro ratas noruegas que vivían en el mismo predio. Todas tenían anticuerpos contra CPXV y de una de ellas se pudo aislar virus idéntico al del cuidador y al de su elefante. Los autores (9) postulan que *Rattus norvegicus* pueda ser también reservorio del virus y aconsejan vacunar con vaccinia a los animales exóticos de circos o del zoológico para protegerlos contra el cowpox.

En septiembre de 2003, tres macacos que habitaban una reserva destinada a animales salvajes desarrollaron una enfermedad compatible con cowpox (10). Un estudio serológico realizado al resto de los monos de varias especies demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes en suero indicando que también habían sido infectados sin presentar sintomatología. En la búsqueda del posible transmisor se estudiaron varias clases de roedores convivientes con los monos, encontrando anticuerpos solamente en la rata marrón, lo que dio a postular que sería el transmisor de la infección, aunque no se descartó que haya ocurrido transmisión entre monos. Afortunadamente los cuidadores del lugar no se infectaron. Con este comentario queda explicado el origen de la figura que muestra cómo se puede mover el CPXV entre especies.

***Características de la enfermedad en el hombre***

La infección del humano con virus cowpox produce lesiones localizadas en la piel en los lugares donde penetró el virus. Las lesiones se parecen a las que origina la vacunación con

vaccinia, aunque la inflamación es mayor (ver fotografía 2). Las pústulas aparecen en las manos y dedos, principalmente los pulgares e índices, pero también en la frente y en los párpados. Rara vez se produce mialgia y fiebre. En las personas inmunocomprometidas se producen lesiones secundarias generalizadas de distinta gravedad. Se han descripto casos severos en pacientes que murieron a causa de la infección. El período de incubación es de nueve a diez días y la evolución de las pústulas es autolimitante. La infección con el virus cowpox en el hombre no es frecuente.

***Fotografía 2*: lesión producida por el cowpox en la frente de un paciente. Se encuentra en su máximo estadío, con una costra central negra y con márgenes inflamados. Tomado de la referencia 11.**

El contagio directo de rata a humano se demuestra por primera vez en el 2002 (11). El caso ocurre en Utrecht, Holanda. Una adolescente de 14 años amante de los animales a tal punto que, recoge a una rata marrón enferma, la cuida hasta que muere y la entierra. La joven, días después, ingresa al hospital de Utrecht con fiebre y lesiones ulcerosas en los labios y pústulas y pequeñas úlceras en los párpados. La evolución de las lesiones hizo pensar en una infección con cowpox de modo que se aisla el virus y se caracteriza genéticamente como tal. Más aún, desentierran a la rata y logran secuenciar el ADN viral resultando ser idéntico al de la joven. De esta forma se demostró inequívocamente que la rata infectada le transmitió el virus por contacto directo.

***Vivir con ratas***

Probablemente sólo con leer este título muchas personas se estremecerán y en su imaginación aparecerá una casucha de chapas o cartones rodeada de terreno baldío con nenes descalzos jugando entre montones de basura. No es el caso que discutimos aquí. Nos referiremos a niños y adolescentes de países europeos centrales que no son pobres pero eligen vivir y compartir juegos con las ratas de compañía, las que se crían para tal fin y se venden en las veterinarias.

***Las ratas mascotas transmisoras de cowpox***

En años recientes se registraron varios brotes de cowpox en personas generalmente jóvenes dueñas de ratas de compañía. El patrón de infección descripto es similar. Animales comprados en la misma veterinaria cuyo proveedor casi siempre es el mismo. Las personas reciben arañazos o mordidas de sus ratas que a los pocos días de ser adquiridas muestran síntomas de enfermedad, generalmente, síndromes respiratorios. Las ratas mueren. A los 10 días aproximadamente las personas afectadas aparecen con pústulas localizadas en diferentes partes del cuerpo acompañadas de gran inflamación y a veces, fiebre y malestar generalizado. Por lo regular, las consultas médicas ante esta situación se hacen a un Instituto de Dermatología. Da la impresión de que los médicos no sospechan inicialmente que se trata de un pox virus y prescriben antibióticos. Las lesiones no mejoran ni aún cuando se recurre al cidofovir, antiviral efectivo contra virus Pox *in vitro*. La sensación es que los médicos no encuentran la clave de la enfermedad, hasta la aparición de las típicas pústulas con centro necrótico semejantes a la viruela y a la lesión que deja la vacunación con vaccinia. Luego se produce o el aislamiento del virus o la visualización de las partículas pox de forma característica de ladrillo. Los tratamientos difieren, pero algunos, como ocurrió en el hospital

de Marsella, recurren a la extirpación de la lesión. Brotes de este tipo se han registrado en Holanda, Alemania y Francia respectivamente (12), (13), (14).

En todos los casos se produjo el mismo ciclo, transmisión de la rata mascota a su dueño y a otros habitantes o visitantes de la casa. Se especula que las ratas infectadas provienen de un mismo proveedor cuyo stock de animales se ha contagiado de las ratas comunes noruegas.

Hasta el presente no se ha demostrado que el cow pox adquirido de las ratas mascotas infectadas se transmita entre humanos, sin embargo sabemos que los virus mutan de modo de lograr expandirse a un mayor número de huéspedes. Cabe preguntarse si con el tiempo no se producirán epidemias y si resultaría oportuno volver a vacunar con la vaccinia que se usó hasta 1980. Estamos frente a casos en que gente que vive en buenas condiciones de higiene y bienestar está alterando con sus gustos peculiares el equilibrio ecológico de un virus, que perdura en el medio ambiente rural junto a los roedores. Parece una paradoja, aquí no se trata del hombre que irrumpe en zonas boscosas o rurales y adquiere nuevas infecciones, en este caso el hombre trae las infecciones emergentes a su domicilio.

Y qué pasa con las áreas pobres de Latinoamérica. ¿Se sabe si estos niños sufren infecciones por cowpox? Es poco probable que la presencia de pústulas sea motivo de consulta médica. Hay males mayores que las encubren que todos conocemos.

Quizás este trabajo sirva de advertencia para aquellos lectores que eligen como amigos a las ratas, por más blancas que sean siempre albergan peligros para nuestra salud.

***Referencias***

1. *Fancy rat- Wikipedia the free encyclopedia. 2009.*

2. *Coto, Celia E. La viruela: peste del pasado, amenaza del presente QuímicaViva Vol. 1, Número 1, diciembre 2002*

*3. Coto Celia E. El camino circular de la vacunación antivariólica Revista QuímicaViva Vol. 2, Número 2, septiembre de 2003.*

*4. Parker S., Nuara A., Buttler RM., Schultz DA.Future Microbiology. 2007, 2:17-34.*

*5: Leite Juliana E. y colaboradores. Passatempo virus a vaccibia virus strain, Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2005 11: 1935.38,*

*6. Crouch AC, Baxby D., McCracken CM., Gaskell RM., Bennett M. Serological evidence for the reservoir hosts of cowpox virus in British wildlife. Epidemiol. Infect.1985 115:185-101.*

*7. Bennett M. y colab. Cow`pox in British voles and mice. J.Comp. Pathol. 1997, 116: 35-44.*

*8. ChantreyJ y colab. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. Epidemiol.Infect.1999. 122:455.60.*

*9. Kurth Andreas y colaboradores. Rat-to-Elephant-to-human transmission of cowpoxvirus. Emerging Infectious Diseases. 2008 14:670-1*

*10. Martina B.EE. y colaboradores Cpwpox virus Transmission to Monkeys, the Netherlands. 2006. 12:1005-7*

*11. Wolfs T., Wagensar,JA., Niesters, H., Osterhaus, A:DME: Rat to human Transmission of Cowpox infection. Emerging Infectious Diseases. 2002. 8:1495-6*

*12. Christian Becker, Dr. med., Andreas Kurth, Dr. rer. nat., Frank Hessler, Dr. med., Harald Kramp, Dr. med., Michael Gokel, Prof. Dr. med., Rudolf Hoffmann, Dr. med., Annette Kuczka, Dr. med. vet., and Andreas Nitsche, Dr. rer. nat.Cowpox Virus Infection in Pet Rat Owners* 2009. Dtsch Arztebl Int. 106: 329–334.

13. *Campe Harmus y colaboradores. Cowpox Virus Transmission from Pet Rats to Humans, Germany. Emerging Infectious Diseases 2008.15:777-80*

14. Ninova L y colaboradores Cow virus Transmission from Pet Rats to Humans, France. *Emerging Infectious Diseases* 2009.15: 781-4.

*** Profesora titular consulta. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA,**

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

*Revista **QuímicaViva***

*Número 2, año 8, Agosto de 2009*

*quimicaviva@qb.fcen.uba.ar*

QuímicaViva
ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

# Rol biológico del selenio en el humano

**Héctor Hernández-Mendoza[1*], María Judith Rios-Lugo[2]**

*[1]Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Avda. Complutense 22, 28040 Madrid, España, E-mail: hector.hernandez@ciemat.es*

*[2]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Av. Complutense s/n, 28040 Madrid, E-mail: jud_rl@yahoo.com*

*Autor para correspondencia:
hector.hernandez@ciemat.es

Teléfonos: + 34 + 91 346 6206
Fax: + 34 + 91 346 6121

Recibido el 03/08/09
Aceptado el 14/08/09

**Resumen**

Desde década de los 70, los esfuerzos en ensayos clínicos con selenio en diferentes centros aplicados a la salud y nutrición humana, han llegado a la conclusión de que el selenio es un elemento esencial en la dieta humana, principalmente en la prevención de muchas enfermedades que no tienen cura definitiva, entre las que se destacan; cáncer, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y complicaciones cardiovasculares. Este trabajo es una pequeña revisión sobre las propiedades antioxidantes y anticancerígenas en humanos, además de conocer aspectos principales funciones del selenio y rol biológico en el humano.

**Palabras claves**: Selenio en humanos; seleno-enzimas; selenoproteínas; suplementos nutricionales.

**Biological role of the selenium in the human**

**Abstract**

Since the 70's decade the efforts in different clinical tests with selenium in center applied to the health and human nutrition, have reached conclusion that the selenium is an essential element in the human diet. Participating mainly in prevention of many diseases that they do not have definitive cures. Among them: cancer, AIDS and cardiovascular complications. This work is a

brief revision of the anti-carcinogenic and antioxidants properties of selenium in humans and its biological roll in human beings.

**Key words**: Selenium; human; seleno-enzymes; selenoprotein; nutritional supplements.

**1. Introducción**

En la naturaleza, el selenio se encuentra ampliamente distribuido en forma de seleniuro combinado con elementos pesados y en menor proporción como elemento libre asociado con azufre elemental e hidrógeno. A su vez, el selenio presenta varios estados de oxidación, formando gran variedad de compuestos inorgánicos y orgánicos, siendo su química compleja en el medioambiente y en los sistemas vivos (Tabla. 1). En el humano [1,2], el selenio ha sido reconocido como elemento esencial en el mantenimiento de las funciones fisiológicas en el organismo, que a su vez, debe ser ingerido en la dieta humana en concentraciones del orden de 70 µg/día en el caso de déficit de selenio [3]. Su disminución o aumento de concentración puede provocar deficiencias [4] o efectos tóxicos [5]. Es por ello que, los efectos beneficiosos del selenio siempre están relacionados con el contenido de selenoproteínas o enzimas dependientes de selenio en el organismo [6-15]. Las fuentes principales del selenio es la ingesta de alimentos que proceden de la dieta diaria y los suplementos nutricionales enriquecidos con selenio [4,16-19], la forma en que se aportan el selenio en este tipo de alimento es unido a proteínas (selenoproteínas de bajo peso molécular, <10 KDa). En la estructura de la selenoproteína, tiene uno o varios átomos de selenio que reemplaza el azufre de los aminoácidos cistina, cisteína y metionina, dando lugar a especies orgánicas de selenio como selenocistina ($SeCys_2$) [20], selenocisteína (SeCys) [21-22], selenometionina (SeMet) [23-24], metil-selenocisteína ($CH_3SeCys$) y seleno-metil-selenocisteína (SCM) [25-26]. En la actualidad estas especies son el objetivo de numerosas investigaciones en el campo del la salud humana, ya que presentan propiedades antioxidantes y anticancerígenas [10,13,14,27-29].

La determinación de selenio en fluidos corporales como; orina, heces, sangre, secreciones biológicas, se basan en técnicas de espectroscopía atómica, en concreto en técnicas como espectrometría de absorción atómica (AAS) [30-34], espectrometría de emisión atómica (AES) [35-36] y espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) [37-39] que han resultado asequibles por su bajo costo y por su alta precisión. Sin embargo, la técnica de espectrometría de masa con plasma acoplado por inducción (ICP-MS) ha tenido un papal evidente en la identificación de especies orgánicas de selenio por su alta sensibilidad y amplio rango dinámico. Los limites de detección del ICP-MS, puede llegar a niveles inferiores de ng/L en diferentes muestras biológicas [35,40-42], por lo que se puede afirmar que su sensibilidad en la determinación multielemental es incomparable con otras técnicas analíticas en el análisis clínico.

Tabla.1. Principales especies de selenio en medioambiente y seres vivos (inorgánicos y orgánicos) [1,4,11,15,20,52,61].

| | |
|---|---|
| Selenio elemental | $Se^0$ |
| Seleniuros metálicos | $Me_2Sen$ |
| Ácido selenoso (selenito) | $SeO_3H_2$ $(SeO3)^{-2}$ |
| Ácido selénico (seleneato) | $SeO_4H_2$ $(SeO4)^{-2}$ |
| Seleniuro de hidrógeno | $H_2Se$ |
| Seleniocianato | HSeCN |
| Sulfuro dimetilselenio | $(CH_3)Se–S(CH_3)$ (volátil) |
| Oxido dimetilselenio | $(CH_3)_2SeO_2$ (volátil) |
| Propianato dimetilselenio | $(CH_3)_2Se+CH_2CH_2COOH$ |
| Metilselenol | $CH_3SeH$ |
| Ácido metilselenico | $CH_3Se(O)OH$ |
| Dimetilseleniuro, DMSe | $(CH_3)_2Se$ (volátil) |
| Dimetildiseleniuro, DMDSe | $(CH_3)_2Se_2$ |
| Dietilseleniuro, DESe | $(CH_3CH_2)_2Se$ |
| Trimetilselenonio,TMSe+ | $(CH_3)_3Se^+$ |
| Selenometionina, SeMet | $HOOCCH(NH_2)CH_2CH_2–Se–CH_3$ |
| Selenocisteína, SeCys | $HOOCCH(NH_2)CH_2–Se–H$ |
| Selenocistina, SeCys2 | $HOOCCH(NH_2)CH_2–Se–Se–CH_2CH(NH_2)COOH$ |
| Selenoetionina, SeEt | $HOOCCH(NH_2)CH_2CH_2–Se–CH_2CH(NH_3)COOH$ |
| Seleno metilcisteina SCM | $HOOCCH(NH_2)CH_2–Se–CH_3$ |
| alfa-Glutamil-Se-metilselenocisteina | $H2NCH_2CH_2–CO–NHCH(COOH)CH_2–Se–CH_3$ |
| Seleno-metil-selenometionina | $(CH_3)_2Se+CH_2CH_2CHNH_2COOH$ |
| Selenohomocisteína | $HOOCCH(NH_2)CH_2CH_2–Se–H$ |
| Selenourea | $Se=C(NH_2)_2$ |
| Selenonocolina | $(CH_3)_2Se+CH_2CH_2OH$ |
| Selenonobetaína | $(CH_3)_2Se+CH_2CH_2COOH$ |
| Se-adenoxilselenohomocisteina | $HOOCCH(NH_2)CH_2CH_2–Se–CH_2C_4H_5C_5N_4NH_2$ |
| Selenoazucares | Estructuras de varios azucares |
| Selenoproteinasy enzimas | GPX, Selenoproteína P, TR, Selenoproteína W, Selenofosfato sintetasa, Selenoproteínas |

**2. Rol biológico del selenio y selenoproteínas en el humano**

Los primeros estudios con selenio en seres vivos fue en la década de los 50 por Schawarz y Foltz [43], los estudios consistieron en la administración de selenio en ratas con necrosis hepática por déficit de vitamina E. Sus resultados demostraron que el selenio tiene una función antioxidante, debido a la reducción de la necrosis hepática en las ratas. Sin embargo, no fue hasta el año 1973, cuando se comprobó la función reductora de la especie $SeCys_2$ presente en la enzima glutationa peroxidasa (GSHPx) [44]. A partir de ese momento, se han hecho varios ensayos clínicos en humanos con el fin de identificar las funciones fisiológicas y bioquímicas presentes en el organismo (Tabla. 2) [45-51], dichas funciones

guardan una estrecha relación con los niveles adecuados de selenoproteínas y enzimas dependiente de selenio en varios órganos vitales (cerebro, sistema endocrino y reproductor) [52-58]. En estos órganos los niveles de enzimas dependiente de selenio como la GSHPx [8,53], Yodotrina iodinasa (ID) [58] y tiorredoxina reductasa (TR) [56-57] pueden ser normales en estados carenciales moderados de selenio, por lo que su función biológica permanece estable, mientras tanto, los niveles de selenoproteína P (Sel P) disminuyen notablemente su actividad biológica [12], afectando principalmente a órganos como el hígado, los músculos esqueléticos y el corazón que presentan lesiones ante niveles carenciales de selenio [59]. La ingestión de complementos nutricionales con selenio, pueden revertir esta situación, provocando que las selenoproteínas y enzimas dependientes de selenio se normalicen [3,4]. Hoy en día, se han identificado entre 30 y 50 especies orgánicas que contienen selenio fuertemente fijado a ellas [60-62]. En el humano, solamente algunas seleno-enzimas y selenoproteínas se han caracterizado como dependientes de selenio por el rol biológico presente en el mantenimiento y funcionamiento del hombre, ya que estas especies de selenio pueden ayudar a combatir varías enfermedades, entre la que destacan, varios tipos cáncer [15,25-28], HIV [8] y complicaciones cardiovasculares [11].

**Tabla. 2. Principales funciones filológicas y bioquímicas presentes en el humano cuando hay un aumento en la ingestión de complementos nutricionales con selenio.**

| Funciones filológicas y bioquímicas del selenio en el humano | Referencia |
|---|---|
| • Reducción de especies de oxígeno reactivas (ROS), especies de oxigeno y nitrógeno reactivas (RNOS), el cual disminuye el daño a membranas y otras estructuras de la célula por radicales libres | 52-57,65-72 |
| • Reducción en la peroxidación de los lípidos y grupos sulfhídrico de la membrana celular (fenómenos que originan la hemólisis) | 14 |
| • Regulación de la síntesis de las proteínas del grupo hemo en el hígado y disminución los ácidos grasos (fenómenos que originan cardiopatías) | 8,52 |
| • Reducción de fenómenos que causan alteraciones eritropoyéticas (originan la hemólisis) | 8 |
| • Reduce la síntesis de tromboxanos y agregación plaquetaría (previene las complicaciones cardiovasculares) | 11 |
| • Disminuiría la necesidad de hospitalización en pacientes contra virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). | 4,8 |
| • Quimiopreventivo contra varios tipos de cáncer | 13,15,27,28 |
| • Marcador biológico en el diagnostico de ciertos tipos de tumores | 48 |
| • Ayuda a pacientes en estados de Respuesta Inflamatoria Sistémica (RIS) y Disfunción Orgánica Múltiple (DOM) tales como la sepsis severa, el trauma grave, la pancreatitis severa y quemaduras críticas se caracterizan por la existencia de estrés oxidativo | 7 |
| • Mejorar el mantenimiento de la salud | 1-2,23 |
| • Aumenta la respuesta celular (interferón, citokinas, proliferación celular y células T) | 1-2 |
| • Mejora la función inmune y disminuye el virus de la polio | 6 |
| • Aumentando la absorción de vitamina A, C, E y disminuye la absorción de arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) | 4 |

### 3. La incorporación del selenio a proteínas

El selenio inorgánico ($Na_2SeO_4$, $NaSeO_3$) se incorpora en el hombre mediante la GSHPx que reduce el selenio hasta llegar a seleniuro de hidrógeno ($H_2Se$), éste suprime radicales libres hasta su bioeliminación (Figura. 1) o se combina con grupos fosfatos formando fosfato de selenio hidrogenado ($HSePO_3^{-2}$) para la síntesis de nuevas selenoproteína [21-22]. En resumen, la síntesis de especies SeCys a partir $HSePO_3^{-2}$ dentro de la célula implica cuatro genes del $RNA^{Sec}$ (selA, selB, selC, y selD). El gen selC codifica la serina; el gen SelA convierte serina a cisteína; el gen selD es el donador de selenio, y el gen selB es el factor de

la traducción que reconoce el selenocisteil-tRNA. Este último lo entrega al codón de iniciación UGA del RNAm para la síntesis de la SeCys [21]. La especie $SeCys_2$ se incorpora de forma específica reduciéndose a SeCys que tiene una estructura igual a la cisteína, diferenciándose únicamente en que un átomo de selenio que remplaza al azufre del aminoácido y la especie SeCys se incorpora reduciéndose a seleniuro de hidrógeno ($H_2Se$). La especie SeMet se incorpora por vías no específica homeostáticamente, dado que el $tRNA^{Met}$ no discrimina entre metionina y SeMet, está se incorpora de manera no específica a proteínas, tales como, la albúmina y hemoglobina para sustituir a la metionina. La SCM se hidroliza obteniendo la SeCys y el metil-selenio, éste último es el más eficiente en la protección contra el cáncer [26].

**4. Enzimas dependientes de selenio**

**Glutatión peroxidasa (GSHPx)**

El papel fisiológico principal de las enzimas GSHPx es antioxidante (acción similar a la vitamina E), disminuye los niveles de concentración de las especies de oxígeno reactivas (ROS) y de las especies de oxigeno y nitrógeno reactivas (RNOS) evitando el daño oxidativo a membranas plasmática. Actualmente, se han descrito cuatro isoformas de la GSHPx en el humano idénticas (tiene peso molecular entre 88 y 107 kDa) y cada una tiene un residuo de SeCys, la glutatión peroxidasa citosólica (cGSHPx), glutatión peroxidasa plasmática (plpGSHPx), fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (phGSHPx) y glutatión peroxidasa gastrointestinal (giGSHPx). La cGSHPx fue la primera enzima dependiente de selenio que se identificó en ratas, conejo, ratón y humano mediante la secuenciación de cDNA, estas comparaciones en estos organismos vivos con el humano reveló que al menos hay un 85-95% de homogeneidad en la secuencia primaria de la enzima [63], donde se ha encontrado una acumulación de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos cerca del sitio activo (SeCys), localizado en la posición 45 sobre la superficie de la subunidad [64]. La función biológica de esta enzima es la protección de la oxidación y peroxidación de los ácidos grasos insaturados y de la que proviene del metabolismo celular (radicales libres). Su localización está asociada a la membrana celular [52]. La enzima plpGSHPx fue aislada en plasma de humano en 1987 [65], su lugar de acción se encuentra en riñón [66] y pulmón [67]. Su estructura es distinta a cGSHPx, ya que es una proteína de secreción que se libera al plasma [67], dentro de su función se encuentra en los tejidos evitando los peróxidos circulantes. La phGSHPx es una enzima que depende directamente de los niveles de selenio en la célula, lo que indica que su principal función es antioxidante. Su localización de esta enzima está estrechamente asociada con las membranas intracelulares debido a que tiene una alta afinidad sobre los hidroperóxidos en este lugar [68]. La enzima giGSHPx fue caracterizada en 1993 [69] y aislado de células de hepatoma , en células y tejido de carcinoma mamario humano. Su función podría estar relacionada con los hidroperóxidos lipídicos ingeridos con la dieta.

**Tioredoxina reductasa (TR)**

En su estructura contiene dos residuos de SeCys (peso molecular 11 kDa) y se han identificado tres isoformas idénticas, la tioredoxina, la ditio-proteína y la TR [56-57]. Esta última es la enzima que se encuentra distribuida ampliamente en varios tejidos. Dentro de sus principales funciones destacan; en la regulación de procesos redox–dependientes intracelulares, en los factores de la transcripción para el control redox de grupos tioles, en los mecanismos de reparación de la síntesis del DNA, actúa como coenzima para cataliza nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato hidrogenado (NADPH) dependiente de la reducción de la tiroxina y estimula la proliferación de las células normales [70].

**Yodotrina iodinasa (ID)**

En su estructura contiene un residuo de SeCys y se ha identificado tres isoformas (peso molecular 30 kDa), la deiodinasa tipo 1 (D1), la deiodinasa tipo 2 (D2) y la deiodinasa tipo 3 (D3) [58,71]. Todas ellas son enzimas microsomales, transmembránica con la porción catalítica (carboxilo termina) en el citosol [72] y se encuentra asociada a la membrana celular. Dentro de sus principales funciones, es la vinculación con la síntesis y metabolismo de las hormonas tiroideas (remueve un átomo de yodo (5´) de la tiroxina transformándola en 3,4,3´-triodotironina), ya que se sabe que la hormona triyodotironina (T3) biológicamente activa es sintetizada por hormona tiroxina (T4), que a su vez depende de enzimas deiodinasa.

**Glutaredoxina**

Hasta el momento no se ha caracterizado su secuenciación de aminoácidos. Sin embargo, esta enzima cataliza la reducción de disulfuro dependientes del enzima glutationa (GSH) y unido a la TR. Además es un donador de electrones para plGSHPx reduciendo los hidroperóxidos en membrana celular [70].

**Selenofosfato-sintetasa SPS2**

Esta enzima esta fue caracterizada por primera vez en bacterias [22], su peso molecular es de 50 kDa y en su estructura tiene un residuo de SeCys, dentro de sus funciones conocidas es necesaria para la síntesis de HSePO3-2 y selenocisteína, lo que indica que es esencia en la síntesis de nuevas selenoproteína.

**5. Selenoproteínas**

**Selenoproteína P (Sel-P)**

Es la selenoproteína contiene de nueve a doce residuos de SeCys (peso molecular 57 kDa) y es la más abundante en sangre y plasma [54,55,74], lo que indica que 60-80% del selenio se encuentra en estos dos especimenes biológicos. La función de esta selenoproteína es antioxidante y actúa como una proteína de transporte. Además esta selenoproteína sirve como marcador biológico al igual que la enzima GSHPx en el déficit de selenio. Se puede expresa en células endoteliales arteriales y hepáticas.

**Selenoproteína de la cápsula espermática (Sel CME)**

Es también es llamada como selenoproteína-34KDa, se ha identificado en espermatozoides de rata [74], en su estructura contiene más de una SeCys, debido a que la secuencia las proteínas que participan en el movimiento del espermatozoide que tiene dieciocho a veinte residuos de cisteína, lo que indica la afinidad del selenio y sus efectos adversos sobre los espermatozoides cuando hay un déficit de selenio [75].

**Selenoproteína W (Sel-W)**

Es una proteína que se identificado en humano, pero si en músculo esquelético y miocardio en rata [76]. En su estructura contiene con un residuo de SeCys y se identificado cuatro isoformas confirmando su actividad antioxidante en rata (peso molecular 8 kDa), hasta el momento no tiene una función conocida en el humano, pero se cree que tiene una posible función redox.

**Selenoproteínas de peso molecular variado [4,20,29].**

La selenoproteína-15kDa está localizada en células epiteliales de la próstata ventral, se opina que tiene una función redox similar a la GPx4 y que posee una acción protectora de las células secretoras frente al carcinoma Selenoproteína-18 es localizado en riñón y otros órganos, sea identificado como una proteína de reserva de selenio.

## 6. Déficit de selenio y suplementos nutricionales enriquecidos con selenio como alternativa

La incorporación del selenio en los seres humanos proviene fundamentalmente de la dieta (carne, pescado, leche, queso, mariscos, frutas, vegetales y cereales). En el caso de los vegetales (principales bioacumuladores de selenio), el contenido de selenio está relacionado con su concentración en el suelo. Existen regiones cuyo contenido de selenio es notablemente bajo, entre las que destacan países con regiones áridas como Australia [77], Corea del Norte, China central, Nepal, Tíbet, África central y particularmente la República Democrática de Congo [78], donde la ingestión de complementos nutricionales con selenio, pueden ser una alternativa en el déficit de selenio en el organismo. Los niveles bajos de selenio en el hombre pueden originar entre otras enfermedades como la Keshan (cardíaca) que afecta principalmente a niños , mujeres embarazadas y en lactancia con una mortalidad del 50% si no se trata a tiempo. Esta enfermedad fue detectada por primera vez en la provincia de Keshan, China (11) y en la actualidad puede prevenirse administrando selenio en la dieta. Otra enfermedad es es la de y la Kashin-Beckse (ósea) que se caracteriza por la rigidez simétrica, tumefacción y dolor de las articulaciones interfalángicas de los dedos, las rodillas y los tobillos.(79). La normalización de la ingesta diaria de selenio que recomienda el Comité de Nutrición y Alimentos del Instituto de Medicina (*Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine*) basarse en la edad (Tabla. 3) [79].

**Tabla. 3. Concentración de selenio en la ingesta diaria que recomienda el Comité de Nutrición y Alimentos del Instituto de Medicina (Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine)**

| Edad | Selenio (µg/día) |
|---|---|
| 0-6 meses | 15 |
| 7-12 meses | 20 |
| 1-8 años | 30 |
| 9-13 años | 40 |
| 14 años y más | 55 |

Por otra parte, M.P Rayman [3,4,51] reconocida especialista en el tema, ha recomendado una ingesta diaria de selenio, teniendo en cuenta factores como el país de origen, la edad y el sexo. Además varios estudios clínicos en humanos por otros especialistas en el tema, han recomendado en el caso que hay una deficiencia de selenio en la ingesta diaria una dosis entre 70-100 µg/día de selenio [49,50,77]. En la actualidad el desarrollo de suplementos alimenticios enriquecidos con selenio se están investigando, ya que presenta una alternativa en la prevención de varias enfermedades citas anteriormente. Las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* enriquecidas han sido las más estudiada en diferentes centros de investigación por su capacidad de biotransformación del selenio inorgánico a SeMet [16,81,82], ya que puede asimilar durante su crecimiento hasta 3 mg/g de selenio inorgánico. Otros biotransformadores de selenio excelente son, las plantas Allium (cebollas, ajos, brécol) [18] y la nuez Brazil nuts [17]. Esta última puede biotransforma hasta 35 µg/g de selenio inorgánico [17]. Por otra parte, los estudios realizados por Andreani et al [83] en bacterias, ha demostrado que el selenio es esencial para las lactobacilos, en especifico las especies *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus fermentum*, donde el selenio tiene un papel funcional en la estimulación enzimática de estos microorganismos. Actualmente, se ha abierto la posibilidad de realizar nuevos alimentos enriquecidos con selenio principalmente en lactaos y su derivados por su rápida biotransformación del selenio a selenoproteínas [19, 84].

**7. Toxicidad del selenio**

El selenio es tóxico en humanos cuando la exposición se prolonga a dosis altas [5]. Sus efectos tóxicos se conocen desde hace mucho tiempo y depende de factores como la forma química, la concentración y las posibles transformaciones que puedan sufrir en su interacción con el medio ambiente. Las formas orgánicas de los elementos por ejemplo, arsénico, mercurio y estaño, suelen considerarse más tóxicas que las especies inorgánicas, por su naturaleza

lipofílica, al poseer mayor facilidad para difundir rápidamente a través de las membranas celulares. Sin embargo, muchas especies orgánicas de selenio son esenciales y forman parte de las proteínas (SeMet, SMC y SeCys2), por lo que su toxicidad potencial es nula. Dentro de las formas inorgánicas, el selenio elemental parece ser el menos tóxico por ser el más insoluble y por tanto difícilmente asimilable por los organismos. Las especies selenito y seleniato presentan toxicidad semejante, otorgándoseles propiedades mutagénicas. En el humano se desconocen los niveles exactos para producir intoxicación crónica, pero cantidades del orden de 2-8 mg/kg son capaces de producir graves lesiones. Se han registrado varios casos de envenenamiento por selenio con un consumo dietético de 5 a 27 mg/kg [5], o por exposición industrial a seleniuros, dióxidos de selenio y oxicloruro de selenio. Los síntomas de selenosis por inhalación son mareos e irritación de las membranas mucosas. Cuando la exposición es elevada produce acumulación de líquido en los pulmones, bronquitis, neumonía, fiebre, dolor de garganta, conjuntivitis, vómitos, dolores abdominales, diarrea y expansión del hígado. Cuando es ingerido puede producir pelo quebradizo y uñas deformadas, sarpullidos, calor, hinchamiento de la piel, dolores agudos. Por último, la bioeliminación del selenio ingeridos por la dieta humana es por vía urinaria en forma metilada ($(CH3)Se^{+}$) o acetilada (acetilgalactosaminado) (Figura. 1). Sin embargo, cuando hay una exposición tóxica, las vías secundarias a la bioeliminación del selenio pueden ser por heces, secreciones biológicas, uñas y pelo.

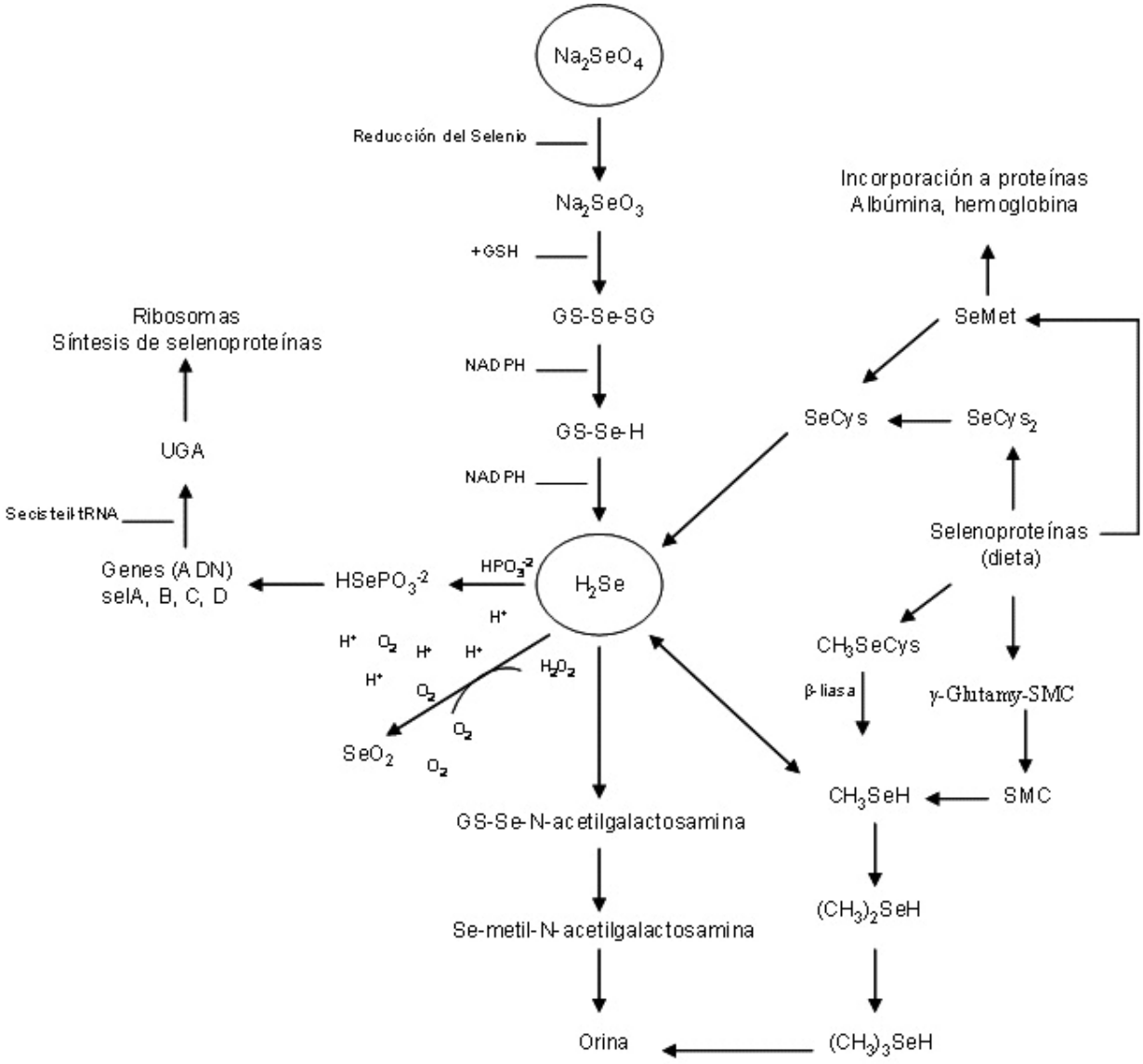


**Figura. 1. Proceso de incorporación del selenio inorgánico ($Na_2SeO_4$, $NaSeO_3$, $Se^{-2}$), metabolismo de selenoproteínas y síntesis de selenoproteínas a partir de $HSePO_3^{-2}$.**

**8. Conclusiones**

Los beneficios del selenio en humanos son más que evidentes. Las seleno-enzimas y selenoproteínas reducción de especies de oxígeno reactivas (ROS), especies de oxigeno y nitrógeno reactivas (RNOS), el cual disminuye el daño a membranas y otras estructuras de la célula por radicales libres. Además actúan en la reducción de la peroxidación de los lípidos y grupos sulfhídrico de la membrana celular. Por tanto, el selenio ayuda ha prevenir y mantener las funciones fisiológicas en enfermedades que tengan un elevado nivel de estrés oxidativo como cáncer, HIV y complicaciones cardiovasculares.

**9. Referencias**

[1] Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: A review. Public Health Nutr. 2001;4(2B):593-599.

[2] Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ. Selenium in the immune system. J Nutr. 2003;133(5 SUPPL. 2):1457S-1459S.

[3] Rayman MP. The argument for increasing selenium intake. Proc Nutr Soc. 2002;61(2):203-15.

[4] Rayman MP. The importance of selenium to human health. Lancet, 2000; 356:233-241.

[5] Yang GQ, Wang SZ, Zhou RH, Sun SZ. Endemic selenium intoxication of humans in China. Am. J Clin Nutr. 1983;37:872-881.

[6] Broome CS, McArdle F, Kyle JAM, Andrews F, Lowe NM, Hart CA, Arthur JR , Jackson M.J. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. Am. J Clin Nutr. 2004;80(1):154-162.

[7] Manzanares CW. Selenium in critically ill patients with systemic inflammatory response. Nutr Hosp. 2007; 22(3):295-306.

[8] Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, et al. Serum selenium, plasma glutathione (GSH) and erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px) levels inasymptomatic versus symptomatic human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. Eur J Clin Nutr. 1997;51:266 –72.

[9].Arnér ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochemistry. 2000;267(20):6102-6109.

[10] Flohé L. The glutathione peroxidase reaction: molecular basis of the antioxidant function of selenium in mammals. Curr Top Cell Regul. 1985;27:473–478.

[11] Levander OA. A global view of human selenium nutrition. Ann. Rev. Nutr, 1987;7:227-250.

[12] Saito Y, Takahashi K. Selenoprotein P: Its Structure and Functions. J Health Sci. 2000;46(6):409-413.

[13] Clark LC, Combs GF, Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. JAMA, 1996;276:1957-1963.

[14] Wilke BC, Vidailhet M, Favier A, Guillemin C, Ducros V, Arnaud J, et al. Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation**.** Clin Chim Acta. 1992;207:137-142.

[15] Brigelius-Flohé R. Selenium Compounds and Selenoproteins in Cancer- Review. Chemi Biodiv. 2008; 5(3):389-395.

[16] Pehrson B, Ortman K, Madjid N, Trafikowska U. The influence of dietary selenium as selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of Suckler cows and on the selenium status of their calves. J Anim Sci. 1999; 77: 3371-3376.

[17] Chang JC, Gutenmann WH, Reid CM and Lisk DJ. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. Chemosphere. 1995;30(4):801-802.

[18] Ip C, Lisk DJ. Enrichment of selenium in allium vegetables for cancer prevention. Carcinogenesis. 1994;15(9):1881-1885.

[19] Alzate A, Cañas B, Pérez-Munguía S, Hernández-Mendoza H, Pérez-Conde C, Gutiérrez AM, Cámara C. Evaluation of the inorganic selenium biotransformation in selenium-enriched yogurt by HPLC-ICP-MS. J Agric Food Chem. 2007; 28;55(24):9776-9783.

[20] Lockitch G. Selenium: clinical significance and analytical concepts. Crit Rev Clin Lab Sci. 1989;27:483-541.

[21] Bock A, Forchhammer K, Heider J, Leinfelder W, Sawers G, Veprek B, et al. Selenocysteine: the 21st amino acid. Mol. Microbiol, 1991; 5(3):515-520.

[22] Stadtman TC. Selenocysteine. Ann Rev Biochem. 1996;65:83-100.

[23] Rayman MP. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: How does it measure up?. Br J Nutr 2004;94(4):557-573.

[24] Waschulewski IH, Sunde RA. Effect of dietary methionine on tissue selenium and glutathione peroxidase (*EC* 1.11.1.9) activity in rats given selenomethionine. Br J Nutr. 1998;60:57-68.

[25] Ip C, Dong Y. Methylselenocysteine modulates proliferation and apoptosis biomarkers in premalignant lesions of the rat mammary gland. Anticancer. Res. 2001;21(2A):863–867.

[26] Ip C, Thompson HJ, Zhu Z, Ganther HE. In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. Cancer Res. 2000;60: 2882-2886.

[27] Lippman SM, Goodman PJ, Klein EA, Parnes HL, Thompson IM, Alan R, Jr, et al. Designing the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). J Natl Cancer Inst. 2005;97:94–102.

[28] Duffield-Lillico AJ, Dalkin BL, Reid ME, Turnbull BW, Slate EH, Jacobs ET, et al. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial .BJUI. 2003;91(7):608-612.

[29] Holben DH, Smith AM. The Diverse Role of Selenium within Selenoproteins-A Review. J Am Diet Assoc. 1999;99:836-843.

[30] Oster O, Prellwitz W. A methodological comparison of hydride and carbon furnace atomic absorption spectroscopy for the determination of selenium in serum. Clin Chim Acta. 1982;124(3): 277-291.

[31] Tiran B, Tiran A, Rossipal E, Lorenz O. Simple decomposition procedure for determination of selenium in whole blood, serum and urine by hydride generation atomic absorption spectroscopy. J Trace Elem Electrolytes Health Dis. 1993;7(4):211-216.

[32] Moreno MA, Marin C, Vinagre F, Ostapczuk P. Trace element levels in whole blood samples from residents of the city Badajoz, Spain. Scie Total Environ. 1999;229;209-215.

[33] Tsalev DL, Lampugnani L, D'Ulivo A, Petrov Jr, I.I, Georgieva, R, Marcucci, K, et al. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of selenium in biological fluids

with rhodium modifier compared with hydride generation atomic spectrometric techniques. Microchem J. 2001;70(2):103-113.

[34] Adányi N, Váradi M, Sziklai-László I, Snyder P, Snyder RD, Cser, MÁ. Determination of selenium balance in healthy children by AAS-hydride generation and by INAA technique. Acta Alimentaria. 2002;31(3):227-234.

[35] Shibata Y, Morita M, Fuwa K. Selenium and arsenic in biology: Their chemical forms and biological functions. Adv Biophy. 1992;28:31-80.

[36] Machát J, Kanický V, Otruba V. Determination of selenium in blood serum by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with pneumatic nebulisation. Anal Bioanal Chem. 2002;372(4):576-581.

[37] Wietecha-Posłuszny R, Dobrowolska J, Kościelniak P. Method for determination of selenium and arsenic in human urine by atomic fluorescence spectrometry. Anal Lett. 2006;39(15):2787-2796.

[38] Mazej D, Falnoga I, Stibilj V. Selenium determination in whole blood, plasma and selenoprotein P by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. Acta Chim Slov. 2003;50(2):185-198.

[39] Rahman L, Corns WT, Bryce DW, Stockwell PB. Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry. Talanta. 2000;52(5):833-843.

[40] González LJM, Fernández Sánchez ML, Sanz-Medel A. Speciation of inorganic selenium and selenoaminoacids by on-line reversed-phase high-performance liquid chromatography-focused microwave digestion-hydride generation-atomic detection. J Anal At Spectro.1996;11(12):1163-1169.

[41] Krachler M, Alimonti A, Petrucci F, Forastiere F, Caroli S. Influence of sample pre-treatment on the determination of trace elements in urine by quadrupole and magnetic sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. J Anal At Spectro. 1998;13(8): 701-705.

[42] Goullé J.-P, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. Forensic Sci Int. 2005;153(1): 39-44.

[43] Schwartz K, Foltz CM. Selenium is an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. J Amer Chem Soc. 1957;79:3292-3293.

[44] Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. Science. 1973;179:588-590

[45] Lombeck I , Kasperek K, Harbisch HD, Becker K, Schumann E , Schröter W, et al. The selenium state of children. Eur J Pediatr. 1978;128(4):213-223.

[46] Steiner G, Menzel H, Lombeck I, Ohnesorge FK, Bremer HJ. Plasma glutathione peroxidase after selenium supplementation in patients with reduced selenium state. Eur J Pediatr. 1982;138(2):138-140.

[47] Lombeck I, Menzel H, Frosch D. Acute selenium poisoning of a 2-year-old child. Eur J Pediatr. 1987;146:308-312.

[48] Persson-Moschos M, Huang W, Srikumar TS, Åkesson B, Lindeberg S. Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status. Analyst. 1995;120:833-836.

[49] Alfthan G, Neve J. Reference values for serum selenium in various areas-evaluated according to the TRACY protocol. J Trace Elem Med Biol. 1996;10:77-87.

[50] Muntau AC, Streiter M, Kappler M, Röschinger W, Schmid I, Rehnert A, et al. Age-related Reference Values for Serum Selenium Concentrations in Infants and Children. Clin Chem. 2002;48:3 555–560.

[51] Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Den Hond E, Thijs L, Fagard RH, et al. Blood pressure and blood selenium: a cross-sectional and longitudinal population study. Eur Heart J. 2007;28: 628-633.

[51] Rayman MP, Thompson AJ, Bekaert B, Catterick J, Galassini R, Hall E, et al. Randomized controlled trial of the effect of selenium supplementation on thyroid function in the elderly in the United Kingdom. Am J Clin Nutr. 2008;87: 370-378.

[52] Stadtman TC. Biological function of selenium. Nutr. Rev.1977;35:161-170.

[53] Arthur JR. The glutathione peroxidises. Cell Mol Life Sci. 2000;57:1825-1835.

[54] Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. J. Nutr. 1994;124:1891-1897.

[55] Steinbrenner H, Bilgic E, Alili L, Sies H, Brenneisen P. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. Free Radical Res. 2006;40(9);936-943.

[56] Park YS, Misonou Y, Fujiwara N, Takahashi M, Miyamoto Y , Koh YH, et al. Induction of thioredoxin reductase as an adaptive response to acrolein in human umbilical vein endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 327:1058-1065.

[57] Hintze KJ, Wald KA, Zeng H, Jeffery EH, Finley JW. Thioredoxin reductase in human hepatoma cells is transcriptionally regulated by sulforaphane and other electrophiles via an antioxidant response element. J Nutr. 2003;133(9): 2721-2727.

[58] Beech SG, Walker SW, Beckett GJ, Arthur JR, Nicol F, Lee D. Effect of selenium depletion on thyroidal type-I iodothyronine deiodinase activity in isolated human thyrocytes and rat thyroid and liver. Analyst. 1995;120: 827-831.

[59] Patching SG, Gardiner PHE. Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: a review. J Trace Elem Med Biol. 1999;13:193-214.

[60] Köhrle J, Brigelius-Flohé R, Böck A, Gärtner R, Meyer O, Flohé L. Selenium in Biology: Facts and Medical Perspectives. Biol Chem. 2000;381:849–864.

[61] Sunde RA. Molecular biology of selenoproteins. Ann. Rev. Nutr, 1990;10: 451-474.

[62] Sunde RA. Intracellular glutathione peroxidases-structure, regulation and function. In Selenium in Biology and Human Health, ed. RF Burk. New York, Springer-Verlag, 1994; 45-77.

[63] Reddy AP, Hsu BL, Reddy PS, Li NQ, Thyagaraju K, Reddy CC, et al. Expression of Glutathione peroxidase I gene in selenium-deficient rats. Nucleic Acids Res. 1988;16:5557-5568.

[64] Ladenstein R, Wendel A. Crystallographic data of the selenoenzyme glutathione peroxidase. J Mol Biol. 1976;104:877-889.

[65] Ursini F, Maiorino M, Roveri A. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme? Biomed Environ Sci. 1997;10:327-332.

[66] Avissar N, Ornt, DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. Am J Phys. 1994b;266:C367-C375.

[67] Takahashi K, Akasaka M, Yamamoto Y, Kobayashi C, Mizoguchi J, Koyama J. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. J Biochem. 1990;108:145-148.

[68] Weitzel F, Wendel A. Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxigenase via the peroxide tone. J Biol Chem. 1993;268:6288-6292.

[69] Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterisation and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. J Biol Chem. 1993;268:2571-2576.

[70] Bjornstedt M, Kumar S, Bjorkhem L, Spyrou G, Holmgren A. Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. Biomed Environ Sci. 1999;10:271-279.

[71] Reed Larsen P. Mammalian type 2 deiodinase sequences: finally, the end of the beginning. J Clin Invest. 1996;98:242-243.

[72] Toyoda N, Berry MJ, Harney JW, Reed Larsen, P. Topological analysis of the integral membrane protein type 1 iodothyronine deiodinase (D1). J Bioch Chem. 1995;270:12310-12318.

[73] Hill KE, Burk RF. Selenoprotein P - an extracellular protein containing multiple selenocysteines. En: Selenium in Biology and Human Health, [R.F. Burk, ed.]. New York: Springer-Verlag. (1994),117-131.

[74] Calvin HI, Grosshans K, Musicant-Shikora SR, Turner SI. A developmental study of rat sperm and testis selenoproteins. J Repr Fert. 1987;81:1-11.

[75] Arthur JR, Beckett GJ. Symposium 2 Newer aspects of micronutrients in at risk groups. New metabolic roles for selenium. Proc Nutr Soc. 1994;53:615-624.

[76] Vendeland SC, Beilstein MA, Chen CL, Jensen ON, Barofsky E, Whanger PD. Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. J. Biol. Chem, 1993;268(23);17103-17107.

[77] Tinggi U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: A review. Toxicol Lett. 2003;137:103-110.

[78] Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. Biomed Pharmacother. 2003;57:134-144.

[79] Moreno-Reyes R, Suetens C, Mathieu F, Begaux F, Zhu D,. Rivera MT, et al. Kashin–Beck Osteoarthropathy in Rural Tibet in Relation to Selenium and Iodine Status. Engl J Med. 1998;339 (16):1112–1120.

[80] Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academy Press, Washington, DC, 2000.

[81] Infante HG, Connor GO´, Rayman MP, Wahlen R, Entwisle J, Norris P, et al. Selenium speciation analysis of selenium-enriched supplements by HPLC with ultrasonic nebulisation ICP-MS and electrospray MS/MS detection. J Anal At Spectrom. 2004; 19:1529-1538.

[82] Casiot C, Szpunar J, Lobinski R, Potin-Gautier M. Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS. J Anal At Spectrom.1999; 14: 645-650.

[83] Andreoni V, Luischi M.M, Cavalca L, Erba D, Ciappellano S. Selenite tolerance and accumulation in the Lactobacillus species. Ann Microbiol. 2000;5:77-87.

[84] Alzate A, Fernández-Fernández A, Pérez-Conde MC, Gutiérrez AM, Cámara C. Comparison of biotransformation of inorganic selenium by Lactobacillus and Saccharomyces in lactic fermentation process of yogurt and kefir. J Agric Food Chem. 2008; 56(18):8728-8736.

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

*Revista **QuímicaViva***

*Número 2, año 8, Agosto de 2009*

*quimicaviva@qb.fcen.uba.ar*

QuímicaViva
ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

# La *dolce vita*: el papel de los azúcares en la biosíntesis de glicoproteínas

**Dr. Julio J. Caramelo**
Departamento de Química Biológica - FCEN -UBA
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (CONICET)
Fundación Instituto Leloir
Av. Patricias Argentinas 435, Buenos Aires, C1405BWE, Argentina
e-mail: jcaramelo@leloir.org.ar
Recibido el 01/07/09
Aceptado el 20/07/09

**Resumen**

El retículo endoplásmico es el lugar en donde se sintetizan las proteínas que ingresan a la vía secretoria. Previo a su salida, las proteínas adquieren su estructura terciaria y, de ser necesario, se ensamblan en oligómeros funcionales. Para facilitar estos procesos existen una gran variedad de chaperonas y enzimas facilitadoras del plegamiento. Asimismo, el estado de plegamiento es monitoreado por un sistema de control de calidad, el cual retiene en el retículo endoplásmico a aquellas especies que no han adquirido su conformación nativa. Si una proteína es incapaz de plegarse correctamente es retenida en el retículo endoplásmico y eventualmente es retrotranslocada al citosol para ser degradada por el proteasoma. Concomitantemente con el plegamiento tienen lugar diversas modificaciones postraduccionales, siendo las más destacadas la *N*-glicosilación y la formación de puentes disulfuro. Cerca de un cuarto de las proteínas de una célula eucarionte son *N*-glicosiladas, siendo la modificación postraduccional más frecuente. En las proteínas que alcanzaron su destino final los *N*-glicanos cumplen papeles fundamentales en diversos procesos de reconocimiento celular. Sin embargo los *N*-glicanos son utilizados también durante la maduración de las glicoproteínas como un sistema que codifica información acerca de su estado conformacional, siendo un elemento clave en varias instancias decisivas a lo largo de la vía secretoria. En este trabajo se presentan las diversas etapas que atraviesa una proteína desde su ingreso al retículo endoplásmico hasta su llegada a su destino final, poniendo especial atención a las funciones tempranas de los *N*-glicanos.

**Palabras clave**: BiP, calnexina, calreticulina, chaperona, control de calidad de plegamiento, glucosiltransferasa, *N*-glicosilación, oligosacaril transferasa, proteína disulfuro isomerasa, retículo endoplásmico.

## La *dolce vita*: the role of sugars on the biosynthesis of glycoproteins

**Abstract**

The proteins that enter the secretory pathway are synthesized in the endoplasmic reticulum. Previously to their exit from the endoplasmic reticulum, the proteins acquire their tertiary structure and, if necessary, they form oligomeric structures. These processes are monitored by a folding quality control system. Those species unable to fold properly are retained in the endoplasmic reticulum and, eventually, are retrotranslocated into the cytosol for their degradation by the proteasome. Along the folding process, several postranslational modifications take place, being the most important the addition of *N*-glycans and the formation of disulfide bridges. About one quarter of the eucariotic proteins are *N*-glycosylated: this is the most common postranslational modification. The *N*-glycans are fundamental in many molecular recognition events once a protein has reached it final destination. In addition, the *N*-glycans are also employed as a system that encodes information about the conformational status of a glycoprotein, playing a central role in many decisive points along the life of a glycoprotein. Here I present the journey of a protein form the endoplasmic reticulum to its final destination, focusing the attention on the early roles played by the *N*-glycans.

**Keywords**: BiP, calnexin, calreticulin, chaperone, endoplasmic reticulum, folding quality control, glucosyltransferase, *N*-glycosylation, oligosaccharyltransferase, protein disulfide isomerase, ,.

**Abreviaturas**: BiP, proteína que une la cadena pesada de las inmunoglobulinas (la HSP70 del RE), CRT, calreticulina; CNX, calnexina; GRP94, proteína regulada por glucosa de 94 kDa (la HSP90 del RE); GT, UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa; PDI, proteína disulfuro isomerasa; RE, retículo endoplásmico

**Introducción**

El retículo endoplásmico (RE) es un sistema intracelular de compartimientos que abarca cerca del 10 % del volumen de un célula eucarionte. Esta organela cumple al menos tres funciones:

**a)** Segundo sitio de síntesis de proteínas, luego del citosol.

**b)** Principal lugar de síntesis de lípidos.

**c)** Principal reservorio intracelular de calcio en células no contráctiles.

Las proteínas que ingresan al RE perteneces a lo que se denomina vía secretoria. Estas proteínas comprenden cerca de un tercio del genoma de una célula eucarionte y tienen como destino final ciertas organelas (RE, aparato de Golgi o lisosomas), la membrana plasmática o la secreción al medio extracelular. La gran diversidad de receptores, transportadores y canales presentes en la membrana plasmática dan cuenta en gran medida de su abundancia en el genoma. En algunos tipos celulares especializados en secreción (linfocitos B activados, células pancreáticas beta, etc.) el RE comprende la mayor parte del volumen celular, y la maquinaria de síntesis proteica está dedicada principalmente a sintetizar unas pocas proteínas. Cuando una proteína ingresa al RE, ya sea co- o postraduccionalmente, lo hace a través de un complejo denominado translocón, cuyo componente central es una proteína integral de membrana llamada SEC61 (1). Esta proteína forma un poro estrecho por el cual ingresan las proteínas en forma desplegada. Luego de ingresar al RE, las proteínas adquieren su estructura terciaria, y de ser necesario se ensamblan en complejos oligoméricos. Estos procesos son supervisados por diversos sistemas de control de calidad, los cuales evitan la salida de aquellas proteínas que no han adquirido su conformación nativa. Las proteínas incapaces de plegarse eventualmente son retrotranslocadas al citosol, en donde son degradadas por el proteasoma en un proceso denominado ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). Concomitantemente con el plegamiento y ensamblado tienen lugar una serie de modificaciones post- y cotraduccionales, siendo las más importantes la formación de puentes disulfuro y la *N*-glicosilación.

**Plegamiento de proteínas en el RE**

El RE dispone de una enorme variedad de chaperonas y enzimas que asisten a la maduración conformacional de las proteínas. Entre las chaperonas clásicas se destacan BiP y Grp94, las versiones del RE de HSP70 y HSP90[1], respectivamente (2-4). BiP es la proteína más abundante de esta organela, dando cuenta de aproximadamente el 5 % del total. Esta chaperona reconoce péptidos hidrofóbicos de unos 7 residuos de longitud, los cuales se unen en un proceso acoplado a la hidrólisis de ATP (5). Para cumplir con su función BiP cuenta con cochaperonas que la asisten en la unión de los sustratos (SEC63 y ERdj3, que son homólogas a HSP40) y en el intercambio de ADP por ATP (denominadas NEFs, por nucleotide exchange factor). Prácticamente todas las proteínas sintetizadas en el RE son asistidas en su plegamiento por BiP. Cuando las proteínas ingresan al RE usualmente son recibidas por BiP.

Para ello son presentadas por SEC63, una homóloga de HSP40 anclada a la membrana del RE que se encuentra asociada al translocón. Se han resuelto varias estructuras del dominio de unión a péptidos y de unión a ATP, y recientemente apareció la primer estructura de la DnaK de *E. coli* completa **(Fig. 1A)**. El sitio de unión a péptidos está formado por una hoja beta, el cual está cubierto por una hélice alfa que funciona como tapa. Esta disposición obliga que los péptidos adopten una conformación extendida para poder unirse a estas chaperonas **(Fig. 1B)**. La estructura de BiP se predice que debería ser muy similar a la de DnaK.

[1]HSP70 y HSP90 significa "heat shock protein" de 70 y 90 kDa, respectivamente.

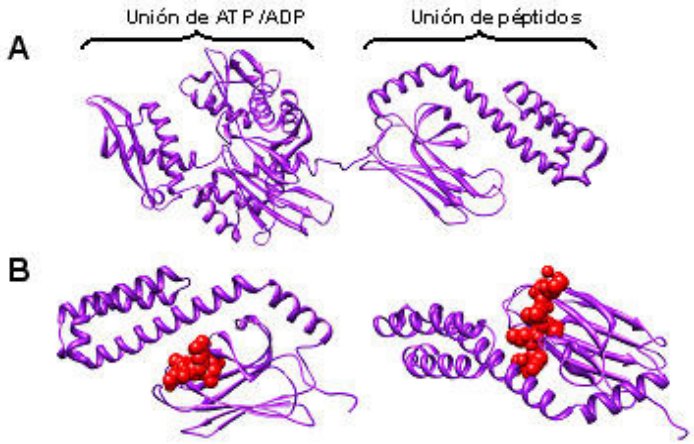


**Figura 1.** (A) Estructura de DnaK con sus dos dominios (PDB: 2KHO). (B) Dos vistas del dominio de unión de péptidos formando un complejo con el péptido NRLLLTG (PDB: 1DKZ).

Las HSP70 pueden adoptar dos conformaciones. En el estado que une ATP el dominio de unión a péptidos presenta una conformación "abierta", en donde la tapa está distanciada de la hoja beta. En esta conformación la velocidad de entrada y salida del sustrato es rápida. La unión de los péptidos gatilla la hidrólisis del ATP y como consecuencia la chaperona sufre un cambio conformacional hacia una forma "cerrada" que atrapa al sustrato (es la mostrada en la **Fig. 1B**). El mecanismo por el cual la unión del sustrato induce la hidrólisis de ATP, es decir cómo se acoplan las actividades de los dominios, no es claro. A continuación se intercambia el ADP por ATP, la proteína vuelve a la conformación abierta y el péptido es liberado **(Fig. 2)**.

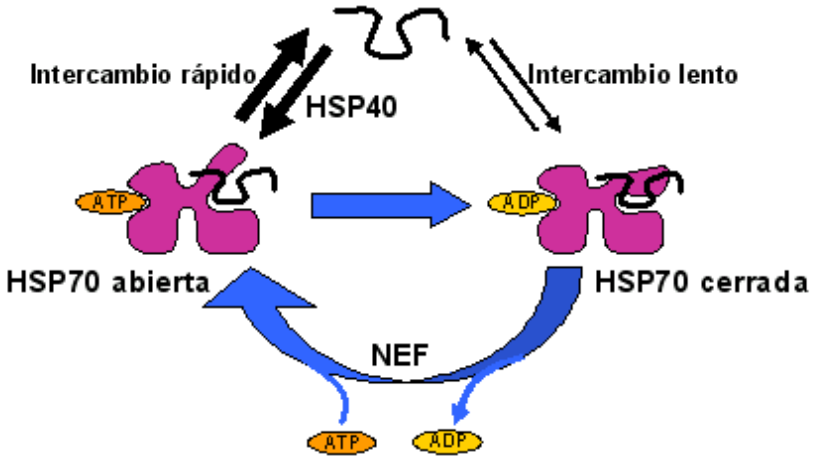


**Figura 2.** Ciclo catalítico de la HSP70

Si bien las HSP70 son fundamentales para la maduración conformacional de muchas proteínas, su mecanismo de acción es llamativamente simple. En principio se limitan a unir y soltar segmentos hidrofóbicos en un proceso acoplado a la hidrólisis de ATP. Su efectividad para favorecer el plegamiento es indirecta, y es principalmente una consecuencia de prevenir la agregación de proteínas mal plegadas. Esto se debe a que mientras la adquisición de la estructura terciaria es un proceso unimolecular, en la formación de agregados intervienen varias proteínas y su velocidad se incrementa notablemente con la concentración. La unión de los intermediarios de plegamiento a la HSP70 disminuye su concentración como especies libres, inhibiendo entonces la agregación.

A diferencia de la HSP90 citosólica, que cumple funciones reguladoras, la principal función de Grp94 a asistir al plegamiento (6). El rango de sustratos de esta chaperona es más reducido que el de BiP, y en general actúa durante etapas avanzadas del plegamiento. No conocemos qué reconoce Grp94 en sus sustratos. Se especula que serían parches de aminoácidos hidrofóbicos expuestos en la superficie. Por otra parte, Grp94 une grandes cantidades de calcio con baja afinidad, siendo uno de los dos buffer de calcio más importantes del RE (el otro es la calreticulina). Llamativamente en el RE no se ha encontrado ninguna proteína de la familia de las chaperoninas (TRIC en el citosol de eucariontes, GroEL en bacterias). Esto puede deberse a que algunas de las funciones que normalmente llevan a cabo las chaperoninas en el citosol podrían ser suplidas en el RE por Grp94.

La principal función de BiP y Grp94 es evitar las interacciones inespecíficas entre los polipéptidos, de forma que previenen la formación de agregados. Asimismo, al ser proteínas residentes del RE, estas chaperonas evitan que las proteínas unidas a ellas prosigan su ruta por la vía secretoria. Es decir que una proteína con defectos estructurales será retenida en el RE. Si una proteína es incapaz de adquirir su conformación nativa, por ejemplo por tener una mutación que afecte su plegamiento, eventualmente se convierte en sustrato del ERAD. Si bien inicialmente se postuló que la degradación de proteínas de la vía secretoria ocurría en los lisosomas, hoy sabemos que este proceso se lleva a cabo principalmente por el proteasoma en

el citosol. Para ello las proteínas deben ser retrotranslocadas, en un proceso que comprendemos muy parcialmente y en el que intervienen numerosos componentes (7). Durante la retrotranslocación las proteínas son desplegadas, y si bien originalmente se postuló que atravesaban la membrana a través del SEC61, hoy sabemos que no es así y han surgido otras proteínas como posibles canales (DERLIN 1, 2 y 3). Del lado citosólico la proteína es recibida por diversos componentes, entre los que se destacan una E3 ubiquitin ligasa asociada a la membrana del RE, una $AAA^+$ ATPasa soluble del citosol (p97) que ayudaría a sacar el sustrato del RE, y una *N*-glicanasa que corta los *N*-glicanos de las glicoproteínas antes de su ingreso al proteasoma.

**Respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR)**

Al acumularse proteínas mal plegadas se activan diversos mecanismos tendientes a restaurar la homeostasis celular, en un proceso denominado unfolded protein response (UPR). La UPR modula la capacidad biosintética de la célula de formas muy variadas. Tres proteínas de membrana residentes en el RE funcionan como sensores de estrés: PERK, ATF6 e IRE1 (8). Las levaduras sólo cuentan con IRE1, mientras que los metazoos disponen de los tres sensores. El mecanismo para detectar la acumulación de proteínas mal plegadas es similar en los tres casos (9). En condiciones de reposo estas proteínas se encuentran unidas a BiP, quien las mantiene inactivas. Cuando se acumulan proteínas mal plegadas BiP se une a ellas, desplazándose de su complejo con los sensores (**Fig. 3**). Este mecanismo de titulación ha sido demostrado de diversas maneras, sin estar del todo claro la concentración de proteínas desplegadas y el grado de perturbación estructural necesarios para iniciar la respuesta.

El primer sensor que se activa es PERK, quien frena la traducción general de proteínas. El sentido de esta respuesta inicial es darle tiempo a las chaperonas para que recuperen las proteínas mal plegadas que se acumularon. El apagado de la traducción sucede bastante rápido (aproximadamente 30 minutos) y usualmente se reinicia al cabo de una o dos horas. PERK es una proteína quinasa que al disociarse de BiP dimeriza, se autofosforila y luego fosforila al factor de elongación eIF2$\alpha$. Esto inhibe el ensamblado del complejo de iniciación de la traducción. Sin embargo existen algunos mRNAs (ATF4, ATF3, etc) que al fosforilarse eIF2$\alpha$ aumentan su traducción, por presentar marcos de lectura abiertos cerca del extremo 5´ de su mensajero. En condiciones normales estos marcos de lectura son leídos eficientemente, de forma que el ribosoma saltea el marco de lectura que se encuentra río abajo. Al fosforilarse eIF2$\alpha$ disminuye la eficiencia en la iniciación de la traducción, y en estas condiciones se puede llegar a leer los marcos que se encuentran río abajo. Eventualmente eIF2$\alpha$ es defosforilado por uno de estos productos, la primera parte de la UPR se apaga y la célula se prepara para las etapas subsiguientes.

A continuación se activan mecanismos que llevan a: (i) la síntesis de más chaperonas, (ii) la activación de la máquina de degradación y, (iii) la síntesis de membrana del RE. Esta última respuesta se cree que incrementa el volumen del RE, de forma de "diluir" las proteínas mal plegadas y dar mas "espacio" para las chaperonas (esta interpretación puede ser

demasiado simple). El sensor que se activa a continuación de PERK es ATF6. Esta proteína posee señales de localización en el Golgi que se encuentran ocultas por BiP, de forma que en condiciones de reposo el complejo se localiza en el RE. Al acumularse proteínas mal plegadas y despegarse de BiP, ATF6 migra al Golgi en donde es cortada por dos proteasas (S1P y S2P) que liberan el dominio citosólico de la misma. Este dominio es un factor de transcripción que activa la síntesis de chaperonas y de XBP1, producto necesario para la siguiente etapa de la UPR. Finalmente el último efector en activarse es IRE1. Esta proteína, de forma similar a PERK, al liberarse de BiP dimeriza, se autofosforila y se prende su actividad de endoribonucleasa. IRE1 cataliza la escisión de un intrón en un mRNA que codifica para el factor de transcripción XPB1. Este proceso de corte y empalme genera una proteína XBP1 con un extremo C-terminal alternativo, la cual presenta actividad como factor de transcripción de numerosos genes que codifican para chaperonas y componentes del ERAD.

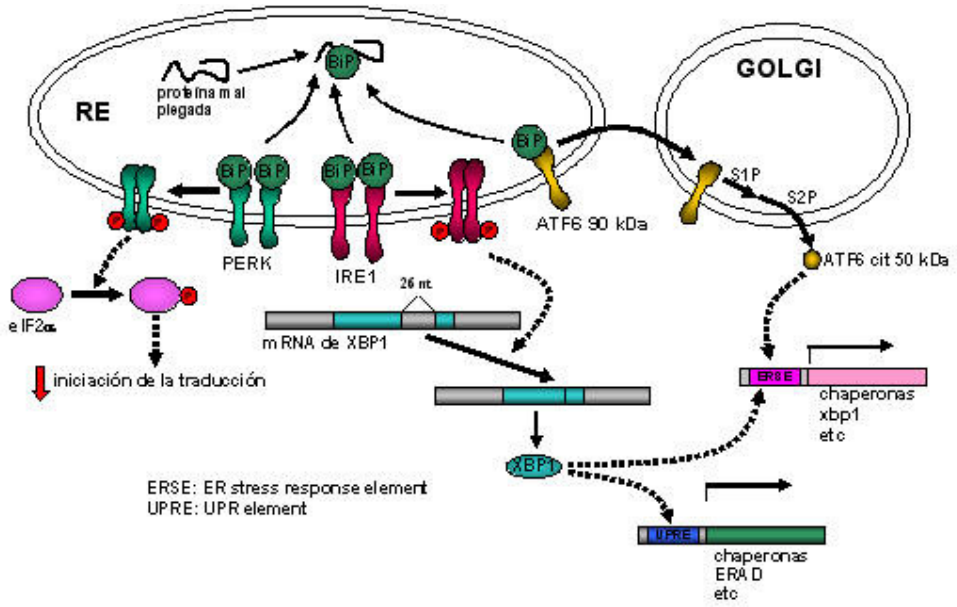


**Figura 3.** Las tres vías de activación de la UPR.

Estas cascadas de señalización están finamente reguladas, de forma que en determinadas situaciones algunas vías puede no prenderse. Es importante mencionar que la acumulación de proteínas mal plegadas no necesariamente implica un proceso patológico. Si bien en el laboratorio la UPR se induce mediante agentes farmacológicos (tapsigargina, tunicamicina, DTT, etc), la UPR también se activa durante procesos de desarrollo y diferenciación celular, los cuales demandan una mayor síntesis de proteínas. Un ejemplo clásico de aumento de demanda de la vía exocítica es la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas, las cuales secretan miles de moléculas de anticuerpos por segundo. Durante este proceso se activan IRE1 y ATF6, y no se prende la vía mediada por PERK (10). Esto tendría lógica, dado que no tiene sentido frenar la traducción justamente cuando se necesita sintetizar proteínas.

**Formación de puentes disulfuro**

Topológicamente el lumen del RE es equivalente al medio extracelular. Una de las diferencias más notables que presenta respecto del citosol es un potencial redox más oxidante, de forma que la oxidación de cisteínas para formar puentes disulfuro es un proceso favorable. Cuando una proteína ingresa al RE presenta sus cisteínas en forma reducida. Aquellas proteínas con más de dos cisteínas tienen la posibilidad de formar más de un puente disulfuro. Por ejemplo, una proteína con 8 cisteínas que dan lugar a 4 puentes disulfuro dispone de 105 combinaciones posibles para formarlos. En este caso, si el proceso de oxidación fuera azaroso tendríamos que menos del 1 % de las proteínas presentarían la combinación adecuada de puentes disulfuro. De no mediar ningún mecanismo que corrija esta situación la mayor parte de estas moléculas serían inactivas, lo cual implicaría un derroche enorme de energía. En la evolución han surgido una familia de enzimas denominadas proteína disulfuro isomerasas (PDI) encargadas de resolver este problema (11).

Las PDIs poseen en su secuencia al menos un dominio homólogo a la tioredoxina, el cual presentan el motivo conservado C-X-Y-C (12). Una de estas cisteínas se encuentra oculta en el interior de la proteína y se la denomina "resolutiva", mientras que la otra está expuesta en la superficie. Estos residuos pueden formar un puente disulfuro entre sí, o alternativamente la cisteína expuesta puede formar un puente disulfuro mixto con otra proteína. Por ejemplo la PDI de *Saccharomices cerivisiae* tiene cuatro dominios homólogos a tioredoxina en el orden a-b-b´-a´ **(Fig. 4)**. Los dominios a y a´ presentan el motivo CGHC y son activos, mientras que los dominio b y b´ no tienen este motivo.

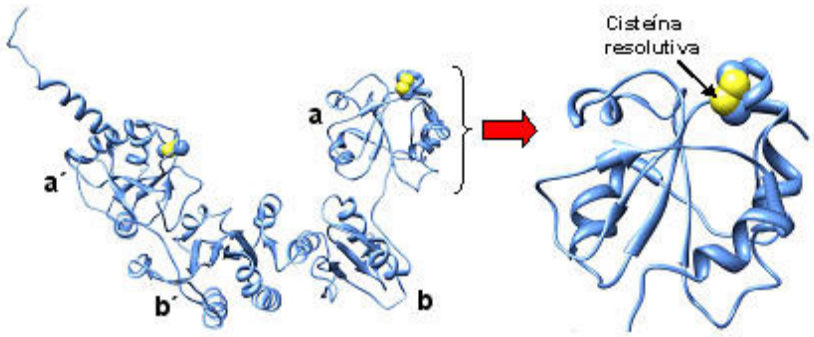


**Figura 4.** Estructura cristalográfica de la proteína disulfuro isomerasa de *S. cerevisiae* (PDB: 3BOA). Izquierda: detalle del dominio a en donde se muestran las cisteínas del sitio activo.

Las PDIs presentan actividad de oxidoreductasa y de disulfuro isomerasa **(Fig. 5)**. Mediante la primera actividad generan los puentes disulfuro. En este proceso la PDI en forma oxidada se reduce al formar un puente disulfuro mixto con una cisteína del sustrato. Este puente se abre en un paso subsiguiente mediante la formación de un puente disulfuro interno del sustrato, quedando la PDI en forma reducida. El resultado de este proceso es la transferencia de un puente disulfuro desde la PDI al sustrato. La PDI reducida es vuelta a

oxidarse mediante un sistema de reciclado en donde el último componente es una enzima denominada Ero1p, la cual transfiere los electrones al oxígeno. Alternativamente aquellos sustratos que ya formaron puentes disulfuro pueden ser reducidos por la PDI para generar un complejo covalente, el cual es resuelto por algún otro residuo de cisteína del sustrato que no formaba parte del puente original. El resultado de este proceso de reducción y posterior oxidación es la isomerización de los puentes disulfuro dentro del sustrato.

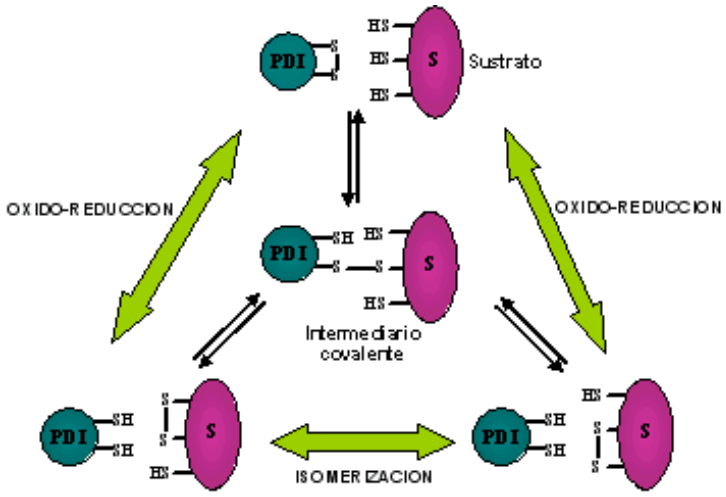


**Figura 5.** Actividades de las PDIs.

Desconocemos si las PDIs "saben" cuando el sustrato formó los puentes disulfuros correctos y por ende deben frenar su actividad. Aparentemente existe un juego entre estabilidad y cinética, en donde los puentes disulfuro "nativos" serían menos susceptibles a ser reducidos por las PDIs. En el retículo de una célula eucarionte hay al menos unas 18 PDIs diferentes. En algunos casos se ha podido identificar que ciertas PDI presentan especificidad por algunos sustratos, por ejemplo la ERp57 es una PDI dedicada a la isomerización de puentes disulfuro de glicoproteínas solubles (13). Sin embargo, todavía estamos lejos de comprender la gran complejidad de este sistema.

### *N*-Glicosilación

La *N*-glicosilación es una modificación en donde el oligosacárido $GlcNAc_2Man_9Glc_3$ se une covalentemente a un residuo de asparagina mediante una unión *N*-glicosídica (**Fig. 6**). Casi todos los eucariontes transfieren este oligosacárido, con la excepción de algunos tripanosomástidos que transfieren $GlcNAc_2Man_9$. El residuo de asparagina modificado forma parte del secuón[2] Asn-X-Ser/Thr, en donde X puede ser cualquier residuo excepto prolina. Asimismo existen casos en donde la secuencia Ans-X-Cys puede ser empleada.

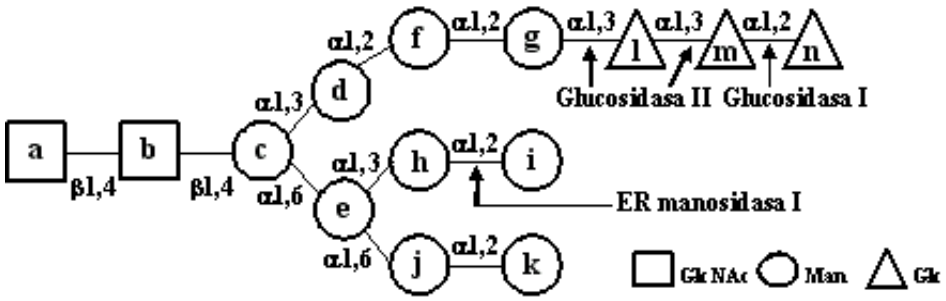


**Figura 6.** Estructura del oligosacárido transferido en el RE y sitios de corte de las enzimas encargadas del procesamiento inicial

El oligosacárido es transferido en bloque desde dolicol-pirofosfato por un complejo llamado oligosacariltransferasa (OST), el cual en vertebrados está compuesto por ocho subunidades diferentes (OST1, OST2, OST3, OST4, OST5, STT3, Swp1 y Wbp1) (14). STT3 es la subunidad catalítica, y es la única subunidad presente en giardia y en los kinetoplástidos **(Fig. 7)**. No es claro el rol de las demás subunidades, aunque se supone que regulan la especificidad de la transferencia (15). Este complejo se encuentra asociado al translocón, de forma que la glicosilación tiene lugar cotraduccionalmente. La presencia de un sitio de glicosilación no garantiza que el mismo vaya a ser modificado y cerca del 85 % de los sitios posibles son utilizados. En este sentido, se ha observado que la tendencia local a formar estructuras secundarias puede modular la eficiencia de la OST. Dado que aproximadamente un tercio de las proteínas de un eucarionte ingresan a la vía secretoria, tenemos que cerca de un cuarto de las proteínas totales son *N*-glicosiladas, siendo la modificación postraduccional más frecuente (16).

[2]Secuón: secuencia conservada de aminoácidos que es modificada químicamente.

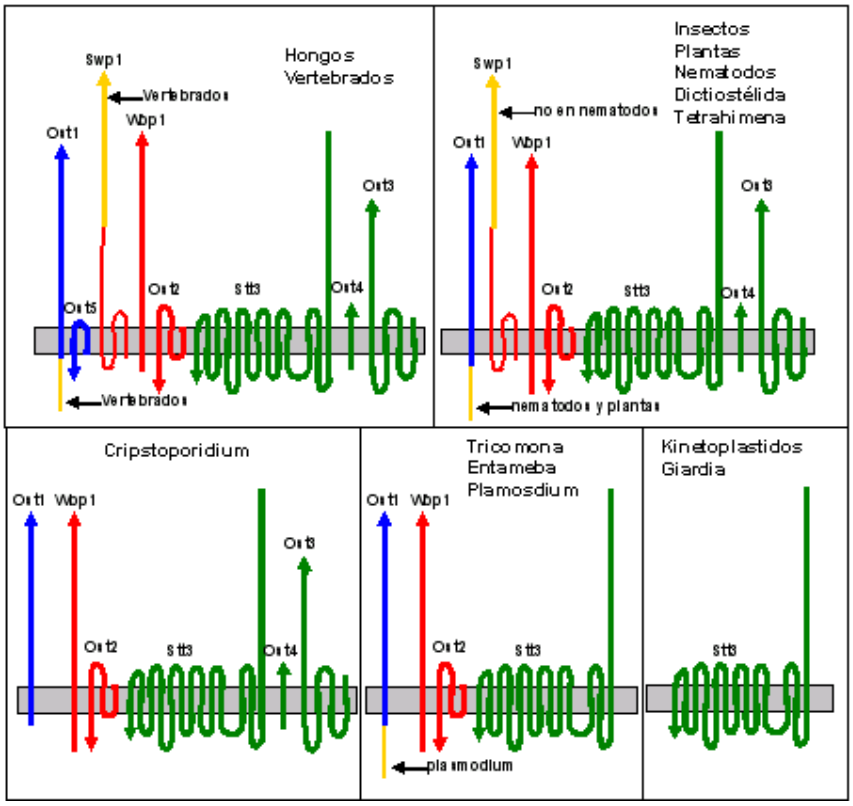


**Figura 7.** Subunidades de la OST presentes en los diversos eucariontes

Si bien inicialmente se postuló que la *N*-glicosilación ocurre siempre cotraduccionalmente, evidencia reciente indica que algunas proteínas pueden ser glicosiladas luego de haber finalizado su síntesis. Llamativamente en vertebrados, plantas e insectos existen dos isoformas de la subunidad catalítica de la OST (STT3A y STT3B). Actualmente se postula que la STT3A estaría dedicada a la *N*-glicosilación cotraduccional, mientras que la STT3B sería responsable de la *N*-glicosilación postraduccional (17). Desconocemos la relevancia biológica de estas observaciones, sin embargo la existencia de dos isoformas de STT3 sería una forma de asegurarse una mayor ocupación de los secuones de glicosilación.

**Funciones de los *N*-Glicanos**

La *N*-glicosilación cumple diversos roles (18). Por un lado, los glicanos son componentes esenciales en procesos de reconocimiento célula-célula y célula-matriz, modulando fenómenos de adhesión, secreción y diferenciación. La gran variedad estructural que pueden presentar los azúcares y la posibilidad modificar el perfil químico de un glicano a los largo de la vida celular las convierten en moléculas ideales para modular estos procesos. Sin embargo, estas funciones, que podríamos llamar "fisiológicas", están superpuestas con efectos directos que ejercen sobre la estructura de las glicoproteínas. Los glicanos son moléculas hidrofílicas de gran tamaño que pueden modular el plegamiento y la estabilidad de las proteínas que modifican. Un glicano de alta manosa pesa unos 2000 Da, mientras que uno tetrantenario polisialilado puede pesar unos 5000 Da. Claramente es una modificación química

bastante más notoria que muchas de las modificaciones postraduccionales más comunes (fosforilación, acetilación, metilación, etc.). En cuanto a la modulación de la estabilidad proteica los efectos son variados (19). En muchos casos la presencia de un *N*-glicano aumenta la estabilidad térmica de una proteína y disminuye la susceptibilidad a proteasas. Sin embargo, en otros tantos casos la estabilidad de una glicoproteínas no se ve afectada luego de desglicosilarla. Por otra parte, en general los glicanos disminuyen la tendencia a formar agregados proteicos, aumentado marcadamente la reversibilidad de los procesos de desnaturalización. Este puede adscribirse a un efecto de "protección hidrofílica", en donde el glicano cubre la superficie proteica previniendo las interacciones inespecíficas, comportándose como si fueran chaperonas químicas. A nivel de la estructura local, la presencia de un glicano favorece la formación de giros en la cadena polipeptídica (20), y muy comúnmente se los encuentra en este tipo de estructuras. Finalmente, algunos glicanos pueden no tener efectos una vez que la proteína adquirió su estructura nativa pero son necesarios para asistir en su maduración conformacional en el RE. Esta gran variedad de funciones dificulta la asignación de un rol específico a un dado glicano. La ausencia de actividad biológica al eliminarse un glicano puede deberse a que forma parte del sitio de unión para un ligando, o a que es necesario para el correcto plegado, sin ser estas posibilidades mutuamente excluyentes. Para el caso de glicoproteínas que presentan más de un glicano, hay ejemplos en los cuales algunos son necesarios para procesos de reconocimiento mientras que otros los son para el plegamiento.

**Síntesis del Dolicol-Oligosacárido**

La biosíntesis de dolicol-P-P-$GlNAc_2Man_9Glc_3$ ocurre sobre ambos lados de la membrana del RE (**Fig. 8**). El primer paso es la generación de dolicol-P-P-GlcNAc sobre el lado citosólico, el cual se sintetiza a partir de dolicol-fosfato y UDP-GlcNAc. A continuación se incorpora el segundo residuo de azúcar, el cual también proviene de UDP-GlcNAc. Los cinco residuos siguientes de manosa también se incorporan de lado citosólico, usando GDP-Man como dador. Luego el intermediario dolicol-P-P-$GlcNAc_2Man_5$ se transloca hacia el lado del lumen del RE en un proceso denominado flipping. Allí se incorporan los demás residuos de manosa y glucosa a partir de dolicol-P-manosa y dolicol-P-glucosa, respectivamente. Estos precursores son sintetizados sobre la hemicapa lumenal de la membrana a partir de dolicol-fosfato, UDP-Glc y GDP-Man. No son claras las razones para esta peculiar distribución entre las hemicapas de la membrana. Se conocen todas las enzimas de esta vía con la excepción de la encargada de la translocación del dolicol-P-P-$GlcNAc_2Man_5$, denominada "flipasa". En levaduras es posible eliminar algunos de los genes de esta vía, de forma de modificar a voluntad el oligosacárido transferido. Por ejemplo, la eliminación del gen *alg5* provoca la transferencia de $GlcNAc_2Man_9$, a las glicoproteínas nacientes, aunque con menor eficiencia. Si bien en la mayor parte de los organismos la *N*-glicosilación se inicia con la transferencia del oligosacárido $GlcNAc_2Man_9Glc_3$, en algunos se transfieren versiones más abreviadas del mismo. Por ejemplo *T. cruzi*, al carecer de la enzima que sintetiza dolicol-P-Glc, transfiere $GlcNAc_2Man_9$.

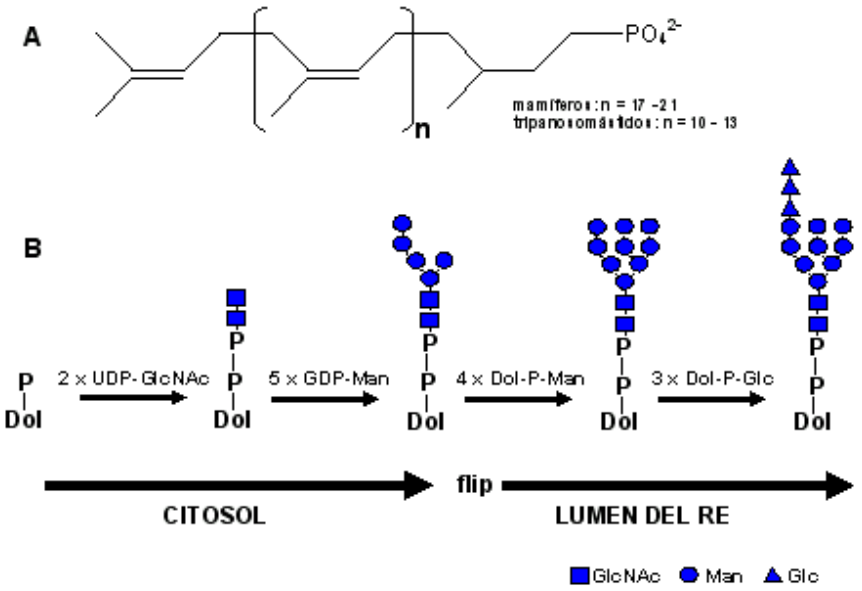


**Figura 8**. (A) Estructura del dolicol fosfato. (B) Biosíntesis del dolicol-P-P-$GlcNAc_2Man_9Glc_3$.

**Procesamiento de los *N*-Glicanos**

La *N*-glicosilación se inicia con la transferencia del mismo oligosacárido para todas las glicoproteínas. Asimismo, el procesamiento inicial que sufre en el RE es común para todas (**Fig. 9**). Después de la transferencia, las enzimas glucosidasa I (GI) y glucosidasa II (GII) eliminan los residuos de glucosa. Estas enzimas se encuentran en el RE, la primera unida a la membrana y la segunda soluble en el lumen. Asimismo es común que mientras la glicoproteínas está en el retículo se pierda la manosa externa de la rama B, reacción catalizada por la alfa manosidasa I del RE (Man I).

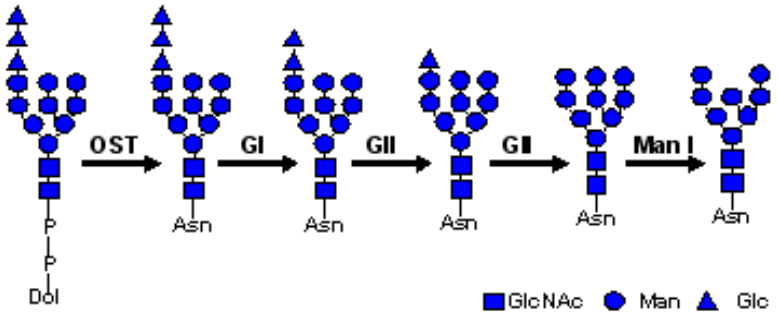


**Figura 9**. Procesamiento inicial de los *N*-glicanos en el RE.

La uniformidad en este procesamiento inicial contrasta con la gran diversidad estructural de los *N*-glicanos presentes en las glicoproteínas maduras. Se pueden encontrar diversos tipos de *N*-glicanos (alta manosa, híbridos y complejos), los cuales pueden presentar otros residuos distintos de los transferidos originalmente (fucosa, ácido siálico, galactosa, xilosa, etc.). Hay que resaltar que mientras tres aminoácidos idénticos pueden formar un único

péptido posible, tres hexosas iguales se pueden combinar de 176 formas diferentes. La gran diversidad de los glicanos maduros es consecuencia de la actividad de diversas glicosidasas y glicosiltransferasas localizadas principalmente en el aparato de Golgi (**Fig. 10**).

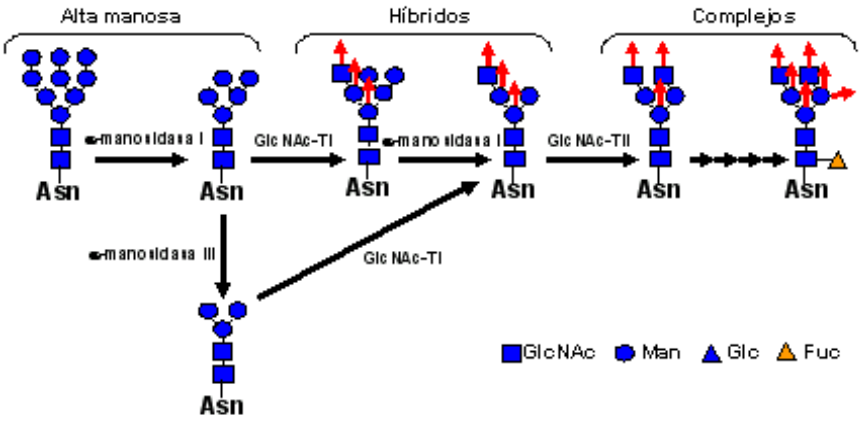


**Figura 10**. Procesamiento de los *N*-glicanos en el Golgi. Las flechas rojas indican sitios en donde se pueden adicionar nuevos residuos.

Los *N*-glicanos maduros preservan el "core glycan" ($GlcNAc_2Man_3$), el cual está compuesto por los cinco primeros residuos presentes en el glicano transferido inicialmente. En los distintos taxones existen vías predominantes para la maduración de los *N*-glicanos. Por ejemplo, en levaduras los más común es la adición de varios residuos de manosa, mientras los insectos usualmente presentan el "core glycan" modificado con fucosa, sin mostrar una mayor elongación de las ramas externas (**Fig. 11**).

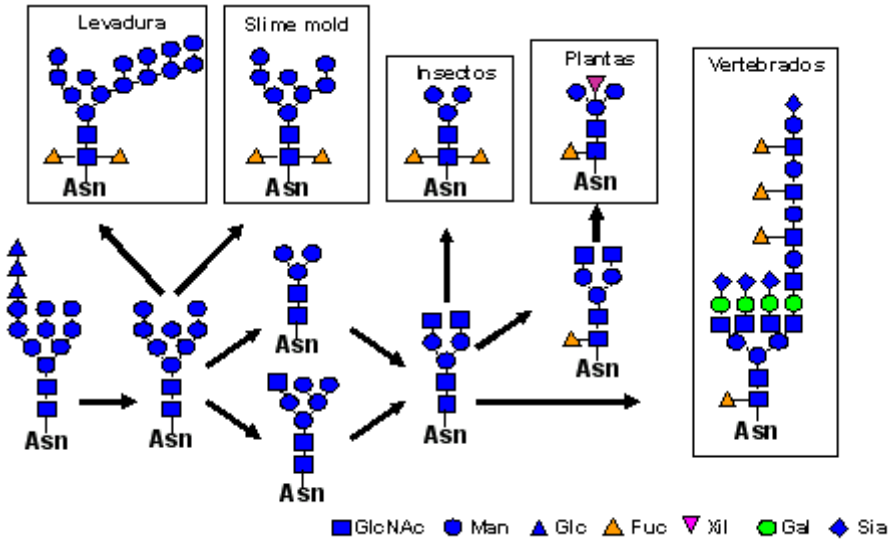


**Figura 11**. Algunos de los glicanos que se encuentran frecuentemente en diferentes taxones.

Como vimos, luego de la transferencia el glicano es procesado hasta llegar al "core glycan". Sin embargo, para la síntesis de $GlcNAc_2Man_9Glc_3$ se emplean una gran cantidad de precursores de alta energía. Surgen las siguientes preguntas: **¿Por qué transferir un compuesto que a continuación va a ser degradado? ¿No sería más conveniente transferir únicamente el "core glycan" y a partir de allí construir el resto del glicano?** Responder estas preguntas tomó más de veinte años de trabajo. Hoy sabemos que los *N*-glicanos son utilizados durante la biosíntesis y plegamiento de proteínas en el RE como un sistema que codifica información acerca de su estado conformacional. Puesto que durante su plegamiento las proteínas deben enfrentar problemas similares, independientemente de su función biológica, las células aprovechan un sistema común basado *N*-glicanos para lograrlo.

**La reglucosilación de proteínas**

Una observación inicial que sugirió funciones tempranas de la *N*-glicosilación fue la detección en *T. cruzi* del oligosacárido $GlcNAc_2Man_9$**Glc** (21). En la mayor parte de los organismos la presencia de este compuesto se explica por la deglucosilación parcial del oligosacárido trasferido, sin embargo como *T. cruzi* transfiere $GlcNAc_2Man_9$, la presencia de glicanos monoglucosilados sólo puede explicarse por una adición de glucosa posterior a la glicosilación inicial (22). Este residuo de glucosa está presente mientras las glicoproteínas se encuentran en el RE, y generalmente no se lo detecta una vez que arribaron a su destino final. Este hallazgo incentivó la búsqueda de esta reacción en otros organismos, encontrándose conservada en prácticamente todos los eucariontes con la excepción de *S. cerevisiae*. La glucosa que se agrega es la última que fue removida por la GII. Asimismo, esta reacción puede darse sobre glicanos que han perdido una o dos manosas, aunque con menor eficiencia. Por lo tanto en el esquema del procesamiento inicial de los *N*-glicanos debemos incluir esta nueva reacción (**Fig. 12**).

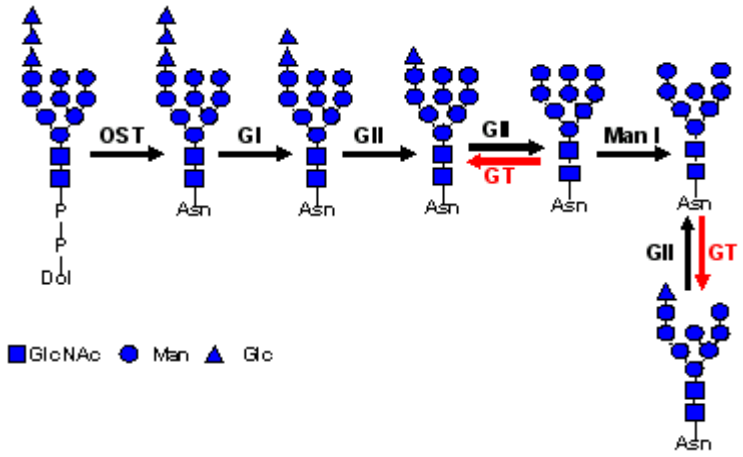


**Figura 12.** Procesamiento de los *N*-glicanos en el Golgi.

La enzima responsable de la reglucosilación se denomina UPD-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (GT o UGGT). Esta enzima utiliza como aceptor a una glicoproteína

conteniendo oligosacáridos de alta manosa ($GlcNAc_2Man_9$, $GlcNAc_2Man_8$ y $GlcNAc_2Man_7$) y como dador de glucosa al UDP-Glc. En su extremo C-terminal presenta una secuencia KDEL de retención, siendo la única glicosiltransferasa soluble en el lumen del RE (23). Los productos de la reacción catalizada por la GT son la proteína glucosilada y UDP. En los primeros intentos para purificar esta enzima se probó como sustrato aceptor a la tiroglobulina bovina y como dador al UDP-[$^{14}$C]-Glc. En teoría, luego de incubar los microsomas con esta mezcla y de precipitar la tiroglobulina con ácido tricloroacético se podría medir la cantidad de glucosa incorporada mediante la radioactividad asociada al precipitado. Si bien en estas condiciones es posible medir la reacción, la actividad enzimática que se obtiene es bastante pobre. Por este motivo la purificación de la GT estuvo frenada durante varios años. Eventualmente se pensó que la tiroglobulina no era un buen aceptor porque sus *N*-glicanos podrían estar ocultos, siendo inaccesibles a la enzima. Por este motivo se probó desnaturalizarla previamente con urea y calor. Al usar este nuevo sustrato se encontró que la reacción era unos dos órdenes de magnitud más rápida que la medida con el aceptor en condiciones nativas. Este nuevo ensayo sirvió como base para purificar la GT, y luego de secuenciar su extremo amino terminal se la pudo clonar. Si la teoría de la baja exposición de los glicanos en la tiroglobulina nativa fuera correcta, un oligosacárido de alta manosa debería se un aceptor óptimo. Contrariamente a lo esperado, estos oligosacáridos son aceptores bastante pobres. Estas observaciones muestran que la GT reconoce los glicanos de alta manosa que están unidos a proteínas desnaturalizadas, mientras que cuando las mismas se encuentran en forma nativa son sustratos pobres. Una observación similar se realizó con diversas glicoproteínas, de forma que la GT reconocería algún aspecto común a las glicoproteínas desplegadas (¿Mayor movilidad de la cadena peptídica? ¿Exposición de residuos hidrofóbicos?).

**La serendipia en el descubrimiento científico**

**Serendipia** (*del inglés serendipity*): hallazgo científico afortunado e inesperado que se realiza de forma casual. Fue acuñado por el escritor inglés Horace Walpole en 1754 a partir de un cuento persa del siglo XVIII llamado «Los tres príncipes de Serendip», en donde los protagonistas, unos príncipes de la isla Serendip (nombre árabe para Sri Lanka), resolvía sus problemas a través de increíbles casualidades.

El descubrimiento de la reglucosilación ocurrió gracias a dos hechos fortuitos, el sistema biológico utilizado (*T. cruzi*) y la forma de marcación ([$^{14}$C]-Glc). Solamente en un kinetoplástido es posible detectar esta reacción, porque estos organismos transfieren glicanos desprovistos de residuos de glucosa. Sin embargo con esto no alcanza. Usualmente para marcar oligosacáridos se emplea [$^{3}$H]-Man, dado que por su mayor radioactividad específica es más barato que el [$^{14}$C]-Glc. De haberse utilizado manosa tritiada hubiera sido imposible detectar los derivados monoglucosilados. Esto se debe a que el análisis de glicanos se realiza mediante cromatografía en papel, en donde los oligosacáridos se detectan por su radioactividad (también se puede usar HPLC). En las marcaciones con [$^{3}$H]-Man los picos

principales que se detectan son $GlcNAc_2Man_9$, $GlcNAc_2Man_8$ y $GlcNAc_2Man_7$, mientras que sus derivados monoglucosilados son de muy difícil detección. En cambio, cuando se marca con [$^{14}$C]-Glc, aunque eventualmente todos los azúcares terminan marcados, en tiempos cortos de incubación lo primero que se marca son los oligosacáridos monoglucosilados, permitiendo así su detección. Si bien la marcación con [$^{14}$C]-Glc es bastante más cara, gracias a la ineficiencia de la Aduana a mediados de los años 70 no era conveniente marcar con [$^{3}$H]-Man. Resulta que la alta actividad específica de este compuesto hace que sufra un proceso de auto degradación denominada radiólisis y por ello no es posible almacenarlo por mucho tiempo. Este problema no se da con el [$^{14}$C]-Glc. Cuando llegaban los envíos del exterior era frecuente que fueran retenidos en la Aduana durante meses por trabas burocráticas de lo más variadas, de forma que cuando la [$^{3}$H]-Man finalmente llegaba al laboratorio era inservible. Este es un buen ejemplo en donde la ineficiencia burocrática adelantó el progreso de la ciencia (no conozco ningún otro).

**Control de calidad de plegamiento**

En paralelo al descubrimiento de la GT se purificó una proteína con actividad de lectina por oligosacáridos monoglucosilados. Inicialmente esta lectina fue aislada por su capacidad para unir calcio, y dada su localización en el RE se la denominó calreticulina (CRT) (24, 25). Al poco tiempo se aisló una proteína paráloga a CRT, la cual está anclada a la membrana del RE y que fue bautizada como calnexina (CNX). Asimismo, desde hacía tiempo se conocía la GII, enzima que revierte la actividad de GT, pero que a diferencia de GT su actividad no es afectada por el estado conformacional de sus sustratos. Por lo tanto a principios de los años 90 se conocían los siguientes componentes:

- CRT y CNX: lectinas residentes del RE que unen glicanos monoglucosilados de alta manosa
- GT: enzima que glucosila glicoproteínas de alta manosa en conformaciones no nativas.
- GII: enzima que hidroliza la glucosa de glicoproteínas monoglucosiladas independientemente de su estado conformacional.

En el año 1994 fue publicado un trabajo que cambió la visión del plegamiento de proteínas en el RE (26). En este artículo se combinaron estos componentes en un mecanismo denominado control de calidad de plegamiento de glicoproteínas (QC). En este ciclo las proteínas ingresan al RE, son glicosiladas con $GlcNAc_2Man_9Glc_3$ y a continuación se remueven las dos glucosas terminales, generando $GlcNAc_2Man_9Glc$ (**Fig. 13**). En esta etapa la glicoproteínas son unidas por CRT y/o CNX, reteniéndolas en el RE. Eventualmente el último residuo de Glc es removido por la GII, y las glicoproteínas se disocian de las lectinas. En esta instancia, si la glicoproteína adquirió se estructura nativa podrá seguir su camino por la vía secretoria. Por el contrario, de no haberse plegado correctamente será reconocida por la GT, quien vuelve a añadir el último residuo de glucosa y regenera el complejo con las lectinas. De esta forma las proteínas que no terminaron de plegarse son retenidas en el RE. Prácticamente todas las glicoproteínas son sometidas a este control de calidad, el cual aumenta la eficiencia

del plegamiento al otorgarle a las proteínas más oportunidades para plegarse correctamente. En general las chaperonas se unen a proteínas desplegadas en un ciclo acoplado a la hidrólisis de ATP. En el fondo el ciclo de CRT/CNX hace algo similar, en donde el papel del ATP es reemplazado por UDP-Glc. Este ciclo puede visualizarse como una chaperona clásica en donde las funciones de reconocimiento de defectos estructurales (GT), unión de proteínas mal plegadas (CRT/CNX) e hidrólisis de UDP-Glc (GT y GII) fueron distribuidos entre varias proteínas. El QC no sólo supervisa la adquisición de la estructura terciaria, sino que también opera durante el ensamblado de oligómeros. Se ha demostrado, por ejemplo para el receptor de linfocitos T, que las subunidades del oligómero son retenidas en el RE hasta que se completa su ensamblado (27). Y de hecho se ha visto en experimentos libres de células que la GT puede reconocer subunidades "huérfanas" (ver abajo).

Como todo control de calidad, este sistema puede presentar dos posibles fallas: por defecto y por exceso. En el primer caso, proteínas que presentan errores en su conformación evaden el QC. Esto puede tener consecuencias desastrosas porque estas proteínas pueden generar agregados tóxicos. Por el contrario, un exceso de celo del sistema podría retener en el RE proteínas biológicamente activas. Existen ejemplos para ambos casos. El caso de la fibrosis quística es muy ilustrativo. Esta enfermedad se origina por la ausencia (o deficiencia) de una proteína de la membrana plasmática que funciona como canal de cloruro denominada CFTR, siendo la enfermedad genética de mayor incidencia en caucásicos (28). Las personas afectadas tienen mutaciones en el gen de CTR que imposibilitan su salida del RE, siendo la más común la ausencia de un residuo de fenilalanina en la posición 508 ($\Delta$F508). Estas proteínas mutantes poseerían actividad biológica si arribaran a la membrana plasmática, sin embargo nunca llegan a su destino final porque son retenidas en el RE por el QC. De hecho la variante silvestre del CFTR presenta una eficiencia de maduración muy baja, y sólo el 10 % de la proteína sintetizada llega a su destino final. Para tratar este tipo de patologías se está explorando la posibilidad de modular al sistema de QC de forma de hacerlo menos eficiente para algunos sustratos (por ejemplo estabilizando el CFTR). En el fondo estos problemas surgen porque unos de los principales dilemas del QC es distinguir las proteínas que están en proceso de plegarse correctamente de aquellas que presentan fallas irreversibles, siendo necesario un delicado equilibrio entre la maquinaria de plegado y la encargada de degradar proteínas.

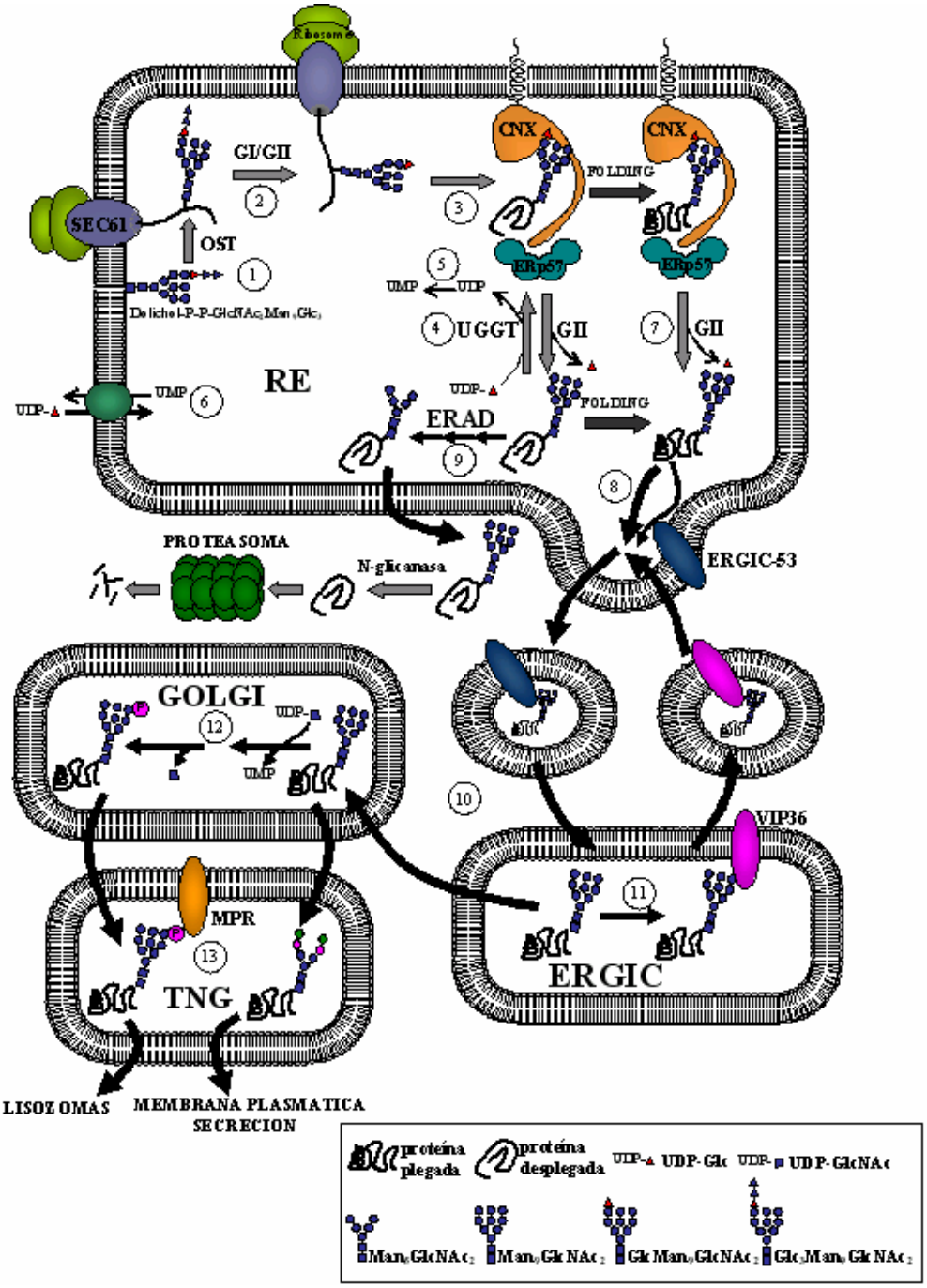


**Figura 13.** Rol de los *N*-glicanos en la vía secretoria. (1) Transferencia inicial de *N*-glicano. (2) Corte de las dos glucosas externas por GI y GII. (3) Unión de los intermediarios monoglucosilados a CRT/CNX. (4 y 5) Reglucosilación por la GT de las proteínas mal plegadas y generación de UDP. (6) Ingreso de UDP-Glc al lumen del RE. (7) Hidrólisis de la última glucosa por la GII. (8) Exportación de proteínas del RE. (9) Degradación de proteínas mal plegadas por el ERAD. (10) Exportación de glicoproteínas hacia el ERGIC por ERGIC-53. (11) Retorno de glicoproteínas desde el ERGIC por VIP36. (12) Generación de Man-6-P en el Golgi. (13) Redireccionamiento de proteínas hacia el lisosoma.

**Estructura de CRT y CNX**

CRT y CNX tienen una identidad de secuencia cercana al 40 % y presentan una estructura muy similar. La principal diferencia es la presencia en CNX de un segmento hidrofóbico cerca del extremo carboxilo terminal que la ancla a la membrana del RE. Ambas proteínas presentan un dominio globular sobre el extremo amino terminal formado por dos hojas beta antiparalelas (dominio N). En este dominio, que es muy similar a las lectinas de plantas leguminosas, reside el sitio de unión para oligosacáridos monoglucosilados. Una característica única de estas lectinas es la presencia de un dominio alargado protruyente, muy rico en residuos de prolina (dominio P). Si bien la actividad de lectina no depende de la presencia del dominio P, se ha demostrado que mejora su actividad como chaperona. A partir de experimentos de difracción de rayos X se resolvió la estructura de la zona lumenal de CNX (dominio P más dominio N), y mediante resonancia magnética nuclear conocemos la estructura del dominio P de CRT (**Fig. 14**) (29). También contamos con fotografías de microscopía electrónica de CRT en donde se observa un dominio globular (dominio N) unido a una zona elongada de gran flexibilidad (dominio P) (30). No disponemos de la estructura del complejo entre las lectinas y sus ligandos, aunque la estructura cristalográfica de CNX sugiere posible un mecanismo de unión.

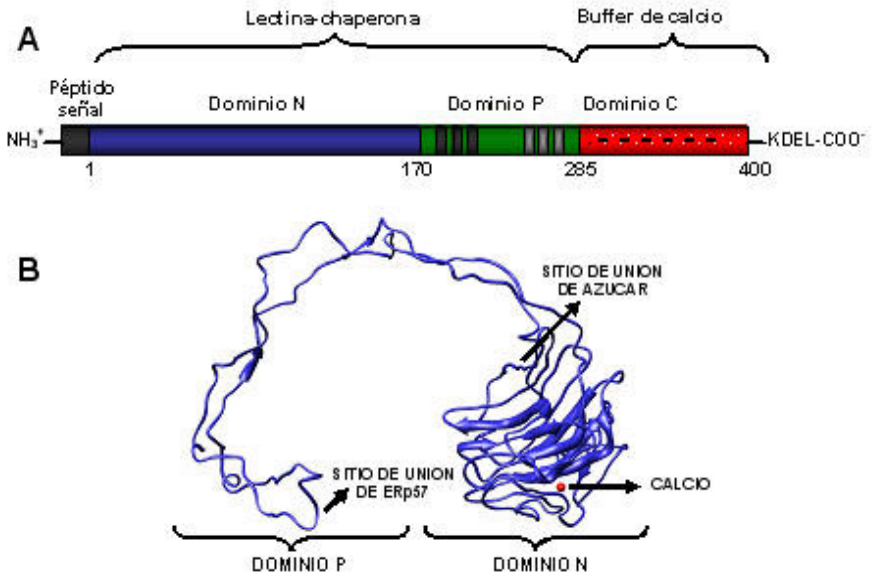


**Figura 14.** (A) Distribución de dominios de CRT. (B) Estructura del dominio lumenal de CNX (código PDB: 1JHN).

La gran flexibilidad del dominio P en principio podría haber evitado la obtención de cristales con la calidad necesaria para la difracción de rayos X. Sin embargo la estructura de esta proteína muestra el dominio P en una conformación definida. Esto se comprende al observar las proteínas vecinas en el cristal, en donde el dominio P rodea al dominio N de una proteína contigua (**Fig. 15**).

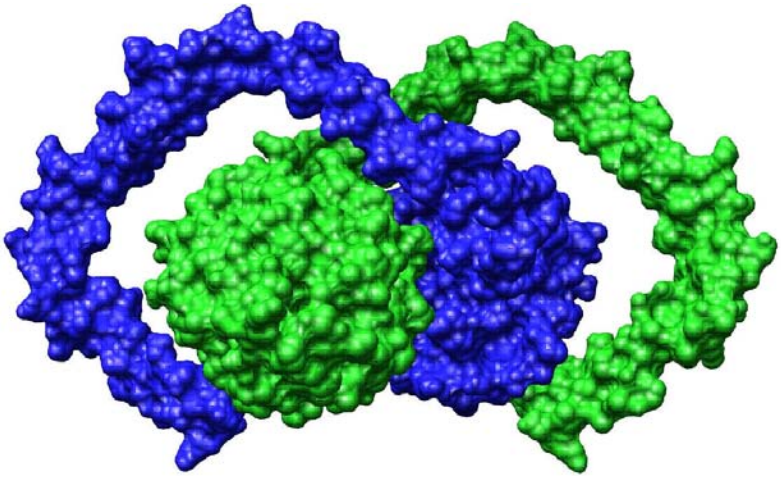

**Figura 15.** Estructura del dominio lumenal de CNX en donde se muestra la proteína más cercana la celda cristalina (PDB: 1JHN).

Posiblemente mientras una glicoproteína se une al dominio N a través de su glicano, el dominio P "abrazaría" a su porción peptídica. Este complejo protegería al sustrato de interacciones no deseadas, previniendo su agregación. Si bien no sabemos qué grado de desplegado presenta un sustrato cuando se une a CRT o CNX, evidencia obtenida *in vivo* sugiere que se unen a intermediarios avanzados de plegamiento, posiblemente como consecuencia de la mayor actividad de GT para con este tipo de estructuras (ver abajo). Por otra parte, la punta del dominio P interacciona con ERp57, una PDI que presenta cierta especificidad por glicoproteínas. De esta forma mientras la glicoproteína se mantiene unida a CRT/CNX, ERp57 ayuda en la formación de los puentes disulfuro nativos. Una comparación de la distribución de dominios entre la PDI clásica y ERp57 es reveladora. Ambas proteínas poseen cuatro dominios homólogos a tioredoxina (a-b-b´-a´), de los cuales sólo los dominios a y a´ presentan el sitio activo para la isomerización. En la PDI los dominios b y b´ están dedicados a unir al sustrato, mientras que en ERp57 estos dominios se unen a la punta del dominio P. De esta forma la presentación de los sustratos a ERp57 estaría a cargo de CRT y CNX, explicando su mayor selectividad por glicoproteínas.

**Reconocimiento por GT**

De los cuatro componentes del QC, el único sensible al estado conformacional de los sustratos es la GT. Esta proteína está presente en prácticamente todas las células eucariontes (con la notable excepción de *S. cerevisiae*) y su tamaño ronda los 160-170 kDa. Está conformada como mínimo por dos dominios. El dominio carboxilo terminal está conservado, comprende cerca del 20 % de la secuencia, une UDP-Glc y allí se localiza el sitio activo de la enzima. El dominio N terminal abarca el resto de la proteína, presenta una gran variedad de secuencia y se supone que es el encargado de reconocer al polipéptido mal plegado. Proteínas quiméricas construidas con dominios N y C de especies diferentes poseen actividad biológica.

Llamativamente en algunas especies existe un segundo gen con alta homología con GT. En humanos los genes para GT se llaman huggt1 y huggt2, y si bien ambos se expresan sólo el primero posee actividad biológica.

Experimentos preliminares revelaron que la GT presenta una preferencia por proteínas desplegadas (31). Recientemente se pudo demostrar que dentro de la miríada de las posibles conformaciones que puede adoptar una proteína mal plegada, la GT prefiere a aquellas que son más compactas y que exponen parches hidrofóbicos. Esto se vio utilizando una familia de proteínas derivadas del inhibidor de quimiotripsina 2 que presenta cortes progresivos en su extremo C-terminal (32, 33). La capacidad de esta familia como sustrato de GT es muy similar a su habilidad para unir el ácido anilino naftalensulfónico (ANS). Este compuesto fluorescente se une a parches hidrofóbicos expuestos, siendo muy útil para detectar intermediarios colapsados de plegamiento. Asimismo, usando como sustrato la aglutinina de soja (SBA) se pudo demostrar que la GT puede reconocer oligómeros desensamblados (34). La SBA es un homotetrámero que puede desensamblarse en monómeros al incubarse con concentraciones bajas de urea. Al disociar la SBA la actividad de GT aumenta de forma paralela a la fracción molar de monómero. De forma similar a lo observado con el CI2, existe aquí una excelente correlación entre unión de ANS y reconocimiento por GT. En este caso el ANS se une a un parche hidrofóbico que se encuentra oculto en la superficie de contacto entre las subunidades del tetrámero, el cual se expone cuando se lo disocia. Estos experimentos fueron hechos en sistemas libres de células y ambos sugieren que la GT participaría durante las etapas avanzadas del plegamiento. Esto se ha podido confirmar en células de *T. cruzi* siguiendo como sustrato modelo la cruzipaína, una abundante proteasa lisosomal (35). Al estudiarse el estado de plegamiento de la cruzipaína se ve que cuando se encuentra asociada a CRT tiene formados gran parte de sus puentes disulfuro. Como en este sistema biológico la única forma que tienen las glicoproteínas de asociarse a CRT es a través de la actividad de GT, estas observaciones sugieren que la enzima reconoció a la cruzipaína en etapas avanzadas de su maduración conformacional. No existe información estructural de la GT, y por lo tanto desconocemos cómo hace para reconocer a sus sustratos.

**Los *N*-Glicanos más allá del RE**

El movimiento de glicoproteínas entre el RE y ERGIC (compartimiento intermedio entre el RE y el Golgi) está mediado en varios casos por receptores con actividad de lectina. Existen al menos dos lectinas que ciclan permanentemente entre ambos compartimentos, ERGIC-53 y VIP36. Estas lectinas presentan un corto segmento del lado citosólico con la secuencia KKFF (ERGIC-53) y KRFY (VIP36) responsable de este movimiento (36). Ambas lectinas tienen afinidad por glicanos de alta manosa. ERGIC-53 participa en la salida del RE de los factores de coagulación V y VIII, y de hecho ciertos tipos de hemofilia se deben a mutaciones en esta lectina. Asimismo la salida de algunas proteasas lisosomales (catepsinas Z y C) también está mediada por ERGIC-53. La actividad de lectina de ERGIC-53 es dependiente del calcio y es óptima a pH 7.4, las condiciones del lumen del RE. Por este motivo la unión de los ligandos a

ERGIC-53 se ve favorecida en el RE. Cuando el complejo llega al ERGIC encuentra un pH ligeramente menor y con una menor concentración de calcio, lo cual gatilla su disociación. La dependencia con el pH de la actividad de VIP36 inversa, y se presume que su función sería llevar de vuelta a algunas glicoproteínas al ER, posiblemente a aquellas que aún no finalizaron su plegamiento y que escaparon del QC (37). No se sabe si VIP36 presenta mayor afinidad por glicoproteínas mal plegadas. En el aparato de GOLGI existe una bifurcación en la vía secretoria, en donde se dividen las proteínas que van a los lisosomas de aquellas que terminan en la membrana plasmática o son secretadas. Aquí también los glicanos cumplen un papel fundamental. Las manosas de las glicoproteínas lisosomales son modificadas con un fosfato en la posición 6, el cual sirve como señal de reconocimiento para receptores específicos (MPR) que las conduce a los lisosomas. Estos sistemas muestran que los glicanos son utilizados en varias instancias decisivas a lo largo de la vía secretoria.

**Perspectivas**

Existen muchas preguntas abiertas acerca de las funciones biológicas de los glicanos. No comprendemos el papel que cumplen durante el reconocimiento de las proteínas que van a ser sustratos del ERAD. Si bien la pérdida de manosas cumple un rol fundamental, no sabemos cómo el sistema distingue entre las proteínas que están en un camino productivo de plegamiento de aquellas irreversiblemente mal plegadas. Aparentemente la baja actividad de la manosidasa del RE les daría tiempo a las glicoproteínas para plegarse, funcionando como una especie de temporizador. Por otra parte, las glicoproteínas sustratos del ERAD son demanosiladas hasta $GlcNAc_2Man_5$, y recién entonces pueden ser retrotranslocadas al citosol. En principio debería existir alguna flipasa que permita el pasaje del glicano a través de la membrana, y dado que en la vía biosintética del dolicol-P-P-oligosacárido el paso de "flipping" sucede cuando el glicano intermediario presenta la misma estructura es tentador pensar que la misma proteína se encargaría de ambos procesos. Por otro lado, recién ahora comenzamos a comprender la compleja regulación de la actividad de la oligosacariltransferasa. Variaciones en los patrones de expresión de las subunidades catalíticas de este complejo (STT3A y STT3B) podría afectar el nivel de glicosilación de ciertas hormonas proteicas, añadiendo un nuevo nivel de regulación de su actividad biológica. Por último, si bien la glicosilación de proteínas hasta hace poco se suponía circunscripta a la vía secretoria, hoy sabemos que muchas proteínas citosólicas pueden ser O-glicosiladas por GlcNAc, modulando diversos procesos de señalización celular. En definitiva, la glicosilación de proteínas pasó de ser una curiosidad bioquímica a jugar un papel clave en diversos procesos de reconocimiento celular y maduración conformacional de las glicoproteínas.

**Bibliografía**

1. Osborne AR, Rapoport TA, y van den Berg B, (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 21:529-50.
2. Kleizen B, Braakman I, (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. Curr. Opin. Cell. Biol. 16:343-9.
3. Paulsson K, Wang P, (2003) Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. Biochim. Biophys. Acta. 1641:1-12.
4. Gething MJ, (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. Semin. Cell. Dev. Biol. 10:465-72.
5. Genevaux P, Georgopoulos C, Kelley WL, (2007) The Hsp70 chaperone machines of Escherichia coli: a paradigm for the repartition of chaperone functions. Mol. Microbiol. 66:840-57.
6. Ni M, Lee AS, (2007) ER chaperones in mammalian development and human diseases. FEBS Lett. 581:3641-51.
7. Vembar SS, Brodsky JL, (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9:944-57.
8. Malhotra JD, Kaufman RJ, (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. Semin. Cell. Dev. Biol. 18:716-31.
9. Sommer T, Jarosch E, (2002) BiP binding keeps ATF6 at bay. Dev Cell. 3:1-2.
10. Gass JN, Jiang HY, Wek RC, Brewer JW, (2008) The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. Mol. Immunol. 45:1035-43.
11. Riemer J, Bulleid N, Herrmann JM, (2009) Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. Science 324:1284-7.
12. Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L, (2008) The human PDI family: versatility packed into a single fold. Biochim. Biophys. Acta 1783:535-48.
13. Jessop CE, Tavender TJ, Watkins RH, Chambers JE, Bulleid NJ, (2009) Substrate specificity of the oxidoreductase ERp57 is determined primarily by its interaction with calnexin and calreticulin. J. Biol. Chem. 284:2194-202.
14. Kelleher DJ, Gilmore R, (2006) An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. Glycobiology 16:47R-62R.
15. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N, (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. Biochim. Biophys. Acta. 1473:4-8.
16. Castro O, Movsichoff F, Parodi AJ, (2006) Preferential transfer of the complete glycan is determined by the oligosaccharyltransferase complex and not by the catalytic subunit. Proc. Natl .Acad. Sci. U S A. 103:14756-60.
17. Ruiz-Canada C, Kelleher DJ, Gilmore R, (2009) Cotranslational and posttranslational *N*-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. Cell 23:272-83.

18. Weerapana E, Imperiali B, (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. Glycobiology 16:91R-101R.

19. Solá RJ, Rodríguez-Martínez JA, Griebenow K, (2007) Modulation of protein biophysical properties by chemical glycosylation: biochemical insights and biomedical implications. Cell. Mol. Life Sci. 64:2133-52.

20. O'Connor SE, Pohlmann J, Imperiali B, Saskiawan I, Yamamoto K, (2001) Probing the effect of the outer saccharide residues of *N*-linked glycans on peptide conformation. J. Am. Chem. Soc. 123:6187-8.

21. Trombetta SE, Bosch M, Parodi AJ, (1989) Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal, and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. Biochemistry 28:8108-16.

22. Bosch M, Trombetta S, Parodi AJ, (1988) Synthesis of dolichol derivatives and protein glycosylation in trypanosomatids. Biochem. Soc. Trans. 16:268-71.

23. Trombetta SE, Parodi AJ, (1992) Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. J. Biol. Chem. 267:9236-40.

24. Waisman, DM, Salimath, BP, Anderson, MJ, (1985) Isolation and characterization of CAB-63, a novel calcium-binding protein, J. Biol. Chem. 260: 1652-60

25. Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RA, Michalak M, (1989) Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 264:21522-8.

26. Hammond C, Braakman I, Helenius A, (1994) Role of *N*-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 91:913-7.

27. Gardner TG, Kearse KP, (1999) Modification of the T cell antigen receptor (TCR) complex by UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. TCR folding is finalized convergent with formation of alpha beta delta epsilon gamma epsilon complexes. J. Biol. Chem. 274:14094-9.

28. Hirsch C, Jarosch E, Sommer T, Wolf DH, (2004) Endoplasmic reticulum-associated protein degradation--one model fits all? Biochim. Biophys. Acta 1695:215-23.

29. Schrag JD, Bergeron JJ, Li Y, Borisova S, Hahn M, Thomas DY, Cygler M, (2001) The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. Mol. Cell. 8:633-44.

30. Tan Y, Chen M, Li Z, Mabuchi K, Bouvier M, (2006) The calcium- and zinc-responsive regions of calreticulin reside strictly in the N-/C-domain. Biochim. Biophys. Acta 1760:745-53.

31. Sousa M, Parodi AJ, (1995) The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. EMBO J. 14:4196-203.

32. Caramelo JJ, Castro OA, de Prat-Gay G, Parodi AJ, (2004) The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates. J. Biol. Chem. 279:46280-5.

33. Caramelo JJ, Castro OA, Alonso LG, de Prat-Gay G, Parodi AJ, (2003) UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100:86-91.

34. Keith N, Parodi AJ, Caramelo JJ, (2005) Glycoprotein tertiary and quaternary structures are monitored by the same quality control mechanism. J. Biol. Chem. 280:18138-41.

35. Labriola C, Cazzulo JJ, Parodi AJ, (1995) Retention of glucose units added by the UDP-GLC:glycoprotein glucosyltransferase delays exit of glycoproteins from the endoplasmic reticulum. J. Cell. Biol. 130:771-9.

36. Hauri HP, Nufer O, Breuza L, Tekaya HB, Liang L, (2002) Lectins and protein traffic early in the secretory pathway. Biochem. Soc. Symp. 69:73-82.

37. Kamiya Y, Kamiya D, Yamamoto K, Nyfeler B, Hauri HP, Kato K, (2008) Molecular basis of sugar recognition by the human L-type lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36. J. Biol. Chem. 283:1857-61.

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

*Revista **QuímicaViva***

*Número 2, año 8, Agosto de 2009*

*quimicaviva@qb.fcen.uba.ar*

QuímicaViva
ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

# Tratamiento biológico de efluentes industriales con contenido en metales: factores a tener en cuenta para un diseño eficiente

# Metal loaded wastewater biotreatments: how to achieve a successful design.

Matías Barrionuevo[1], María Alejandra Daniel[1], Luciana Garavaglia[1], Nerina Méndez[2] y Griselda Sosa[1], Roberto Candal[3], Silvia Cerdeira[1], Helena Ceretti[1], Silvana Ramírez[1], Eduardo Reciulschi[1], Anita Zalts[1] y Diana L. Vullo[1,2].

1- Área Química, Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de General Sarmiento (UNGS), J.M. Gutiérrez 1150, (B1613GSX) Los Polvorines, Buenos Aires.

2- Área Microbiología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

3- INQUIMAE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Email: dvullo@ungs.edu.ar; dvullo@qb.fcen.uba.ar

Recibido el 20/07/09

Aceptado el 03/08/09

**RESUMEN**

El desarrollo de un biotratamiento eficiente para efluentes con contenido en metales, requiere del conocimiento de las interacciones metal-microorganismos, microorganismo-superficies y metal-componentes del efluente, de manera de efectuar un aprovechamiento máximo de la capacidad retentiva o biotransformadora bacteriana. Para la puesta a punto e implementación de sistemas de tratamiento biológico de efluentes industriales con contenidos de Cd(II), Zn(II) y Cr(VI) es indispensable, en un primer paso, de un diseño y funcionamiento de biorreactores en escala laboratorio. De esta manera estamos desarrollando métodos de remediación de efluentes industriales, con particular interés en los efluentes de procesos de galvanoplastía. Para cumplir el objetivo principal del proyecto de investigación en curso estudiamos: a) la biosorción y/o biotransformación de metales mediada por bacterias aisladas de ecosistemas contaminados sumado a modificaciones de la movilidad bacteriana en presencia de metales; b) la capacidad de adhesión microbiana a diferentes matrices formando películas; c) el comportamiento de la comunidad microbiana y d) la capacidad de complejamiento de los componentes del medio con el metal.

**Palabras clave:** metales, bioremediación, biosorción, biotransformación, quimiotaxis, capacidad complejante.

**ABSTRACT**

For the development of a successful biotreatment for wastewaters containing metals, studies on metal-microbes, microbe-surfaces and metal-environment interactions are required. The correct design of bioreactors for electroplating wastes at laboratory scale is the first step of our research project. In order to fulfil our general aim, several aspects should be studied: a) Cd(II) and Zn(II) biosorption and Cr(VI) biotransformation performed by indigenous bacteria; b) metal influence on bacterial motility; c) bacterial capacity of biofilm development and microbial community behaviour and d) complexing capacity of environment components with Cd(II) and Zn(II).

**Keywords:** bioremediation, metals, biosorption, biotransformation, chemotaxis, complexing capacity.

**INTRODUCCIÓN**

La contaminación de los suelos y de las aguas subterráneas y superficiales se origina en prácticamente cualquier actividad humana económica o culturalmente importante. La remediación definitiva de estos sitios requiere la extracción de los contaminantes. Desgraciadamente, las técnicas de remediación empleadas actualmente son muy costosas y, en el caso particular de los suelos, suelen afectar la fertilidad y/o el uso posterior de los mismos, mientras que en el caso de los acuíferos y aguas superficiales, puede comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para el consumo humano.

Teniendo en cuenta a todos los metales presentes en nuestro planeta, podemos clasificarlos en tres grandes grupos (Duffus, 2002): 1. Esenciales para procesos biológicos y a su vez no tóxicos a concentraciones altas (Clase A) 2. Esenciales pero tóxicos más allá de una concentración límite (“Borderline”) y 3. Netamente tóxicos (Clase B). Dicha clasificación está basada en el comportamiento como ácido de Lewis que cada catión metálico posee, ya que de ello depende su tendencia hacia la formación de complejos con diferentes familias de ligandos. Por ejemplo el Ca y el K son metales no tóxicos, pertenecientes a la Clase A; Cr y Mn son metales esenciales para ciertos procesos biológicos pero más allá de una concentración límite ejercen cierta toxicidad debido a la capacidad de formar ciertos complejos con ligandos biológicos (Borderline) y por último Cd, Hg y Pb que no poseen utilidad biológica y ejercen una acción tóxica gracias a su alta afinidad por grupos funcionales con O, N y S (Clase B).

Numerosos efluentes industriales presentan concentraciones relativamente altas de muchos metales, entre los cuales se encuentran aquellos pertenecientes tanto al grupo 2 como al 3. Actividades tales como procesamiento o reciclado de metales (no ferrosos) y tratamientos superficiales como las galvanoplastías, producen habitualmente efluentes con contenidos de Cd, Zn, Cu, Pb, Hg, Ni o Co. En el caso de Cr es común encontrarlo como Cr(VI) en efluentes relacionados con actividades como la fabricación de pigmentos y curtiembres además de los procesos galvánicos. Las industrias asociadas a tales actividades efectúan ciertos tratamientos

de efluentes basados en la precipitación química (Demir, 2007; Zoubolis, 2004). Sin embargo, dicha precipitación no permite la remoción de concentraciones bajas de los metales, generalmente complejados y en coexistencia con material orgánico (Lim, 2003, van Veen, 2002). Generalmente los tratamientos químicos son útiles cuando las concentraciones son mayores a 100 mg/L, no siendo el caso de muchos de los efluentes estando o no parcialmente tratados. En tales situaciones es necesaria la implementación de un tratamiento biológico mediante el desarrollo de biorreactores acordes al metal a remover del sistema (Diels, 2003; Konovalova, 2003; Chirwa, 1997). La actividad industrial que utiliza metales dentro de sus procesos es netamente global y el cuidado en la eliminación de sus desechos es de alta relevancia en cualquier ámbito. La prevención de la contaminación es el primer paso hacia la conservación adecuada de todos los espacios de nuestro planeta, por lo que el desarrollo de un tratamiento biológico eficiente y accesible debería ser de interés tanto para industrias nacionales como extranjeras.

Las estrategias microbianas de supervivencia frente a metales Clase B y "borderline" se encuentran ampliamente estudiadas (Lovley, 2000; Valls, 2002). Aprovecharlas en beneficio del ambiente es una posibilidad a tener en cuenta en el momento del correcto diseño de un sistema de biorremediación que asegure la eficiencia del proceso (Bender, 2004; Gadd, 2000; Malik, 2004).

Cuando se trabaja con microorganismos es necesario evaluar cuál será el destino de los residuos biológicos del proceso involucrado. Resulta entonces imprescindible conocer la inocuidad desde el punto de vista sanitario y la implicancia de la liberación de dichos microorganismos al ambiente. Los microorganismos aislados de ecosistemas contaminados son supervivientes de aquellos efectos tóxicos provocados por metales mediante el funcionamiento de diferentes mecanismos biológicos, por lo que representan potenciales microremovedores siempre y cuando no posean relevancia clínica.

La aplicación de las estrategias microbianas de detoxificación de metales como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre forma la base del tratamiento biológico de efluentes industriales. Dichas estrategias se basan en la adsorción superficial microbiana del metal de interés (caso Cu(II), Cd(II) y Zn(II)), mecanismo denominado biosorción (Ahluwalia, 2007; Guibaud, 2009; Lu, 2006; Pal, 2008; Vijayaraghavan, 2005), o bien en la biotransformación del metal, en el caso de Cr(VI) (Konovalova, 2003; Thacker, 2007; Nkhalambayausi-Chirwa, 2001; Asatiani, 2005; Megharaj, 2003; Abate, 2007), mediante la cual se produce un cambio en el estado de oxidación del metal que favorece su precipitación posterior como material insoluble.

En el caso de la remoción de Cu, Cd y Zn por el mecanismo de biosorción es necesario implementar un proceso que funcione en fase heterogénea mediante la inmovilización de células sobre soportes de bajo costo. Para lograr un sistema eficiente y exitoso, debería asegurarse la adhesión de los microorganismos a las diversas superficies utilizadas como soportes. Dicha adhesión no es siempre posible cuando se trabaja con células adaptadas a desarrollarse en suspensión, como es el caso de cepas cultivadas en un laboratorio. La utilización de microorganismos aislados a partir de diversos ecosistemas resulta en un

beneficio adicional, debido a que en sus ambientes naturales éstos ya se encuentran íntimamente relacionados con superficies de diferentes orígenes formando las llamadas biopelículas (biofilms). El empleo de microorganismos organizados en biopelículas para diversos procesos de biorremediación posee una serie de ventajas (Singh, 2006; Perumbakkam, 2006). Entre ellas podemos mencionar, por ejemplo que estos procesos a) permiten trabajar en fase heterogénea facilitando una circulación continua del efluente a tratar; b) posibilitan una mejor adaptación y supervivencia bacteriana, especialmente en situaciones de estrés, ya que la protección de la estructura macromolecular de la matriz mejora la eficiencia del proceso manteniendo intacta la actividad biológica de interés. El estudio de la formación de una biopelícula y sus condiciones ambientales óptimas, así como también la estructura, los fenómenos de quimiotaxis bacteriana (Caiazza, 2007; Kato, 2008; Pandey, 2002), transporte de nutrientes y solutos de interés ambiental asociados a la misma son de fundamental importancia a la hora de implementar procesos de tratamiento de efluentes mediante la utilización de reactores de lecho fijo o fluidizado.

Los fenómenos de adhesión, agregación y biosorción dependen de las propiedades eléctricas de las superficies bacterianas por lo que el estudio de la movilidad electroforética es imprescindible para la comprensión y optimización del funcionamiento del tratamiento biológico a implementar (Tsuneda, 2004; Eboigbodin, 2006; Deng, 2005, Borrok, 2005, Bingol, 2005)

En el caso de la biotransformación de Cr(VI) a Cr(III) es necesario mantener las células en continuo crecimiento, ya que se trata de una reducción enzimática, por lo que los reactores adecuados tendrían el formato de un quimiostato. El efluente liberado a partir de los mismos enriquecido en Cr(III) sería procesado para lograr la separación efectiva de dicho catión en el medio líquido, como $Cr(OH)_3$ utilizando agentes floculantes.

Así como el desarrollo de un biotratamiento eficiente requiere del conocimiento de las interacciones metal-microorganismos, es necesario conocer en detalle las interacciones microorganismo-superficies y metal-componentes del efluente, de manera de efectuar un aprovechamiento máximo de la capacidad retentiva microbiana. Por lo tanto, con un trabajo interdisciplinario se busca integrar los resultados que surjan como consecuencia del mismo, lo que no es común encontrar en la bibliografía disponible. En el Área Química Ambiental de la UNGS hemos desarrollado un proyecto de investigación que actualmente se encuentra en curso, cuyo objetivo general es la puesta a punto e implementación de sistemas de tratamiento biológico de efluentes industriales con contenidos de Cd(II), Zn(II) y Cr(VI) a través del diseño y funcionamiento de biorreactores en escala laboratorio. De esta manera estamos desarrollando métodos de remediación de efluentes industriales, con particular interés en los efluentes de procesos de galvanoplastía. Para cumplir nuestro objetivo estudiamos: a) la biosorción y/o biotransformación de metales mediada por bacterias aisladas de ecosistemas contaminados sumado a modificaciones de la movilidad bacteriana en presencia de metales, es decir interacciones metal-microorganismos; b) la capacidad de adhesión microbiana a diferentes matrices formando películas, por lo tanto las interacciones bacteria-superficies; c) el comportamiento de la comunidad microbiana, es decir interacciones bacteria-bacteria y d) la

capacidad de complejamiento de los componentes del medio con el metal, o sea interacciones metal-entorno. Este proyecto es netamente interdisciplinario en donde todos los aspectos de la Química se hallan representados: Microbiología, Química Analítica (Electroquímica), Fisicoquímica, Química Orgánica y Química Biológica. La integración del conocimiento generado es la vía de comprensión de los fenómenos en estudio para el éxito en el cumplimiento de nuestro objetivo general.

Este trabajo resume el grado de avance alcanzado por nuestro grupo y muestra la evolución que hemos tenido a lo largo de estos años desde que el artículo *Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente*, fue publicado en esta revista Química Viva, Año 2 Número 3, en el año 2003.

## MICROORGANISMOS

Los microorganismos con los que trabajamos son cinco cepas bacterianas, que fueron aisladas a partir de ecosistemas con conocidos niveles de contaminación con metales. Dichas bacterias poseen capacidad adsortiva para Cd(II) y Zn(II) y además capaces de reducir Cr(VI) a Cr(III). Estas cinco cepas fueron identificadas por secuenciación del gen del rARN 16S como *Pseudomonas veronii* 2E, *Delftia acidovorans* AR, *Klebsiella oxytoca* P2, *Klebsiella ornithinolytica* 1P y *Ralstonia taiwanensis* M2.

## INTERACCIONES METAL-BACTERIA

### Biosorción de Cd(II) y Zn(II): estudios fisicoquímicos sobre *Pseudomonas veronii* 2E.

Habiendo evaluado la capacidad biosortiva de los microorganismos aislados, se escogió a *Pseudomonas veronii* 2E como objeto de estudio, debido a los mayores rendimientos obtenidos (Vullo, 2008) en cuanto a biosorción se refiere. Se utilizaron dos estrategias para estudiar la interacción metal-bacteria: a) el desarrollo de isotermas de adsorción para Cd(II), para Zn(II) y para mezclas de ambos y búsqueda de un modelo fisicoquímico que ajuste para la comprensión del fenómeno y b) la exploración de los cambios en la carga superficial bacteriana por efecto de los iones metálicos, mediante mediciones de movilidad electroforética en presencia de Cd(II), Zn(II) y mezclas de ambos (Méndez, 2009).

#### a) Isotermas de adsorción

La construcción de isotermas de adsorción consistió en exponer suspensiones bacterianas, con masa celular constante, a diferentes concentraciones de Cd(II) (0 a 2 mM), Zn(II) (0 a 0,5 mM) y a mezclas de ambos (diferentes combinaciones con 0,5 y 0,1 mM de concentración total). Luego de una incubación a 32ºC durante 24 hs. se midió el metal remanente en los sobrenadantes por Voltametría de Preconcentración Electrolítica, luego de centrifugar (3.000 x g, 15 min) y filtrar las muestras (0,45 µm de diámetro de poro). El pH de las mezclas metal-bacteria debió mantenerse regulado ya que la adsorción es un fenómeno dependiente de este parámetro. En particular el pH=7,5 fue regulado con solución de HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etansulfónico], pKa= 7,5) 10 mM. Al graficar q, es decir la

cantidad de metal retenida por g de peso seco bacteriano en función de la concentración de metal en equilibrio se obtiene el gráfico de la Figura 1.A.

El valor de q se calcula como:

$$q = (C_i - C_{eq}) \times V_t / m_t$$

donde $C_i$ es la concentración inicial del metal $C_{eq}$ es la concentración de metal en equilibrio, $V_t$ es el volumen total de la mezcla y $m_t$ es la masa total bacteriana expresada en peso seco.

La isoterma obtenida para Cd(II) difiere de la de Zn(II) en cuanto a la capacidad máxima de adsorción, es decir el valor de q al cual se llega al plateau de la curva es mucho mayor en el caso del cadmio.

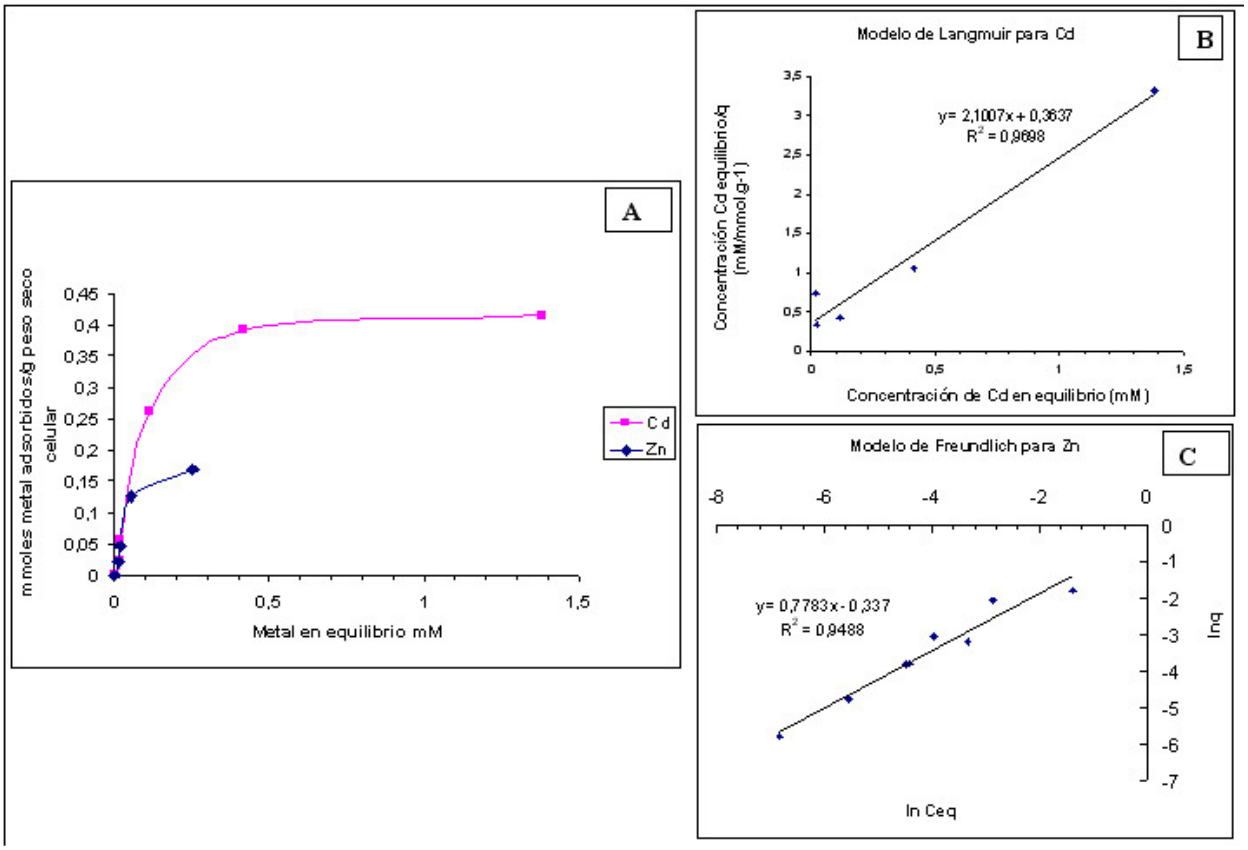


**Figura 1. A. Isotermas de adsorción de *Pseudomonas veronii* 2E para Cd(II) y Zn(II). B. Linealización según el modelo de Langmuir para Cd(II) y C. Linealización según el modelo de Freundlich para Zn(II).**

Para comprender el fenómeno de adsorción se estudió el ajuste de nuestro sistema biológico a algunos de los modelos fisicoquímicos establecidos. Se ensayaron dos modelos: Langmuir y Freundlich. El modelo de Langmuir establece la existencia de una monocapa superficial adsorbente saturable. Cada partícula adsorbida no modifica la capacidad adsortiva

de la monocapa, por lo que las interacciones adsorbente-adsorbato son independientes. Las expresiones que se obtienen para este modelo son:

$$q = q_{max} \cdot C_{eq} / (K_d + C_{eq}) \qquad \text{o} \qquad C_{eq}/q = K_d / q_{max} + C_{eq} / q_{max}$$

siendo $q_{max}$ la capacidad adsortiva máxima y $K_d$ es la constante de equilibrio de disociación metal-superficie. Si se grafica $C_{eq}/q$ vs. $C_{eq}$ y el gráfico resulta lineal, significa que el sistema se ajusta a este modelo. La biosorción de Cd(II) aparentemente ocurre por un mecanismo acorde con el modelo de Langmuir (Figura 1.B., Vullo, 2008).

El modelo de Freundlich no considera la existencia de una monocapa homogénea sino una superficie heterogénea en donde no todos los sitios de interacción son iguales e independientes. No se puede aproximar a una capacidad adsortiva de saturación máxima, ya que la superficie se va modificando a medida que la adsorción progresa. Matemáticamente hablando, la isoterma de Freundlich se define según la siguiente ecuación:

$$q = K_F \cdot C_{eq}^{\ 1/n}$$

donde $K_F$ y n son llamadas constantes de Freundlich, características de cada sistema y son indicadores de la capacidad e intensidad del proceso de adsorción. Si se aplica ln a la ecuación anterior se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln q = \ln K_F + (1/n) \ln C_{eq}$$

Por lo tanto si se grafica ln q vs. ln $C_{eq}$, y se obtiene un gráfico lineal quiere decir que el sistema responde a este modelo. En nuestro caso ocurre con Zn(II), según puede observarse en la Figura 1.C.

¿Qué pasó con las mezclas de Cd(II) y Zn(II)? Los valores de q obtenidos son bien diferentes de acuerdo a la concentración total inicial de ambos metales. Cuando esta concentración es baja (0,1 mM) el valor de q total permanece constante entre 0,05 y 0,06 mmoles de metal/g peso seco celular, mientras que cuando la concentración inicial total es 0,5 mM q aumenta con la concentración de Cd(II) hasta coincidir con los valores de q obtenidos con Cd(II) solo.

Todos estos resultados sugieren una interacción metal-bacteria diferente dependiendo del metal involucrado. Es probable que dicha interacción esté dada por sitios superficiales distintos.

**b) Movilidad electroforética bacteriana**

La interfase formada entre la cubierta externa bacteriana y el entorno extracelular juega un rol importante dentro de la fisiología microbiana. Los componentes de esta capa externa son fundamentalmente macromoléculas con grupos funcionales carboxilato, fosfato y amino, que

confieren una carga expuesta superficial de signo negativo. La carga electrostática influye sobre la polaridad e hidrofilicidad, propiedades determinantes de las funciones celulares. La carga superficial celular se puede estimar mediante la determinación de potencial zeta (ζ), que es el potencial eléctrico de la región interfacial entre la superficie bacteriana y el entorno acuoso. La ecuación de Smoluchowski:

$$\zeta = (\eta \,.\, \mu) / (\varepsilon_0 \,.\, \varepsilon)$$

relaciona al potencial zeta con la movilidad electroforética (μ), η es la viscocidad del medio, $\varepsilon_0$ es la permitividad del vacío y ε es la constante dieléctrica del medio.

La movilidad electroforética es una propiedad intensiva que indica la habilidad de las partículas de moverse en un campo eléctrico. Una modificación sobre la superficie provocada por la interacción con un catión, modificaría la carga neta negativa de la superficie celular y, por ende, μ. Además μ depende de la fuerza iónica del medio y obviamente del pH, por lo que ambos parámetros deben mantenerse constantes a lo largo de las mediciones. Las mismas suelen realizarse por una técnica denominada *light scattering* utilizando un instrumental especial como por ejemplo "Brookhaven 90-plus zetameter". En la Figura 2. se representa la variación de la movilidad electroforética en función de la concentración del catión en condiciones de fuerza iónica constante (KCl 10 mM) y pH constante (pH=7,5, buffer HEPES 10 mM). En ambos casos la presencia del catión hace menos negativa la carga neta superficial, es decir μ se hace más positiva. El comportamiento de Cd(II) es bien diferente al del Zn(II). A concentraciones bajas de Cd(II) μ se modifica y permanece constante más allá de una concentración 0,05 mM, mientras que recién a una concentración de Zn(II) de 0,2 mM, μ llega a un valor constante. Los valores de μ son más positivos en presencia de Zn(II) comparados con los del Cd(II). Esto se debe a un mayor efecto pantalla que ejercen las cargas positivas del catión de menor radio, es decir la carga superficial negativa se encuentra menos expuesta con zinc que con cadmio.

Estos resultados permiten confirmar la suposición de que la interacción Cd(II)-bacteria ocurre en sitios diferentes que la interacción Zn(II)-bacteria. Si bien ambos metales difieren en los sitios de afinidad, esto no quiere decir que sean independientes entre sí, es decir que la presencia de uno puede llegar a modificar la interacción de la célula con el otro.

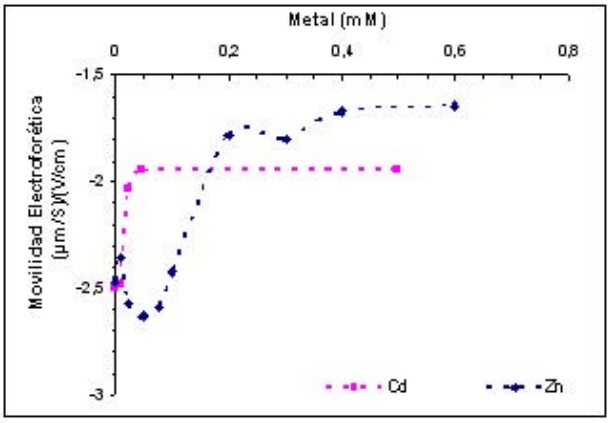


**Figura 2. Movilidad electroforética de *Pseudomonas veronii* 2E en presencia de cadmio o zinc.**

**Biotransformación de Cr(VI)**

La capacidad microbiana de reducir Cr(VI) a Cr(III) puede estar mediada por la actividad de la enzima cromato reductasa, descripta por varios autores (Thacker, 2007). No solamente es necesaria la biotransformación de Cr(VI) para la remoción del cromo de un efluente industrial, sino que también es imprescindible lograr una separación del mismo de los sobrenadantes obtenidos en dicho proceso. Dicha separación del sistema acuoso consiste en la inmovilización del Cr(III) en su forma insoluble $Cr(OH)_3$. Si bien este compuesto es altamente insoluble en agua, la formación y floculación de $Cr(OH)_3$ requiere de ciertas condiciones fisicoquímicas del entorno.

¿Cómo se comporta el Cr(III) en agua? Forma una serie de acuocomplejos como por ejemplo:

$$[Cr(H_2O)_6]^{3+} + H_2O \rightleftharpoons [Cr(H_2O)_5(OH)]^{2+} + H_3O^+$$

Ahora bien, si esta solución se trata con una solución de NaOH 0,1M ocurre lo siguiente:

a. Primer paso: precipitación a un pH cercano a 7

$$[Cr(H_2O)_6]^{3+} + 3OH^- \rightleftharpoons [Cr(H_2O)_3(OH)_3]\ (s) + 3\ H_2O$$

b. Segundo paso: redisolución del precipitado a pH altamente alcalinos

$$[Cr(H_2O)_3(OH)_3]\ (s) + 3OH^- \rightleftharpoons [Cr(OH)_6]^{3-} + 3\ H_2O$$

Considerando la constante del producto de solubilidad, el pH al cual comienza la precipitación sería alrededor de 7 para una concentración inicial de Cr(III) de 0,045 mM. Dicho valor corresponde a concentraciones encontradas en efluentes industriales, que a su vez exceden los límites establecidos para su descarga (menor que 2 mg/l o 0,038mM según la Resolución

336/03 de la Provincia de Buenos Aires y Resolución 79.179/90 de Recursos Hídricos de la Nación Argentina).

Por lo tanto además de testear la capacidad bioreductora de las bacterias, es necesario poder separar exitosamente el cromo mediante procesos químicos de floculación acoplados con la biotransformación.

En la Tabla 1 se muestran los máximos valores obtenidos en cuanto a la biotransformación de Cr(VI) de cultivos bacterianos en lote, tanto puros como mixtos (Garavaglia, 2009). La desaparición de Cr(VI) se midió utilizando técnicas espectrofotométricas de acuerdo a recomendaciones internacionales (APHA, 1998).

**Tabla 1. Remoción de Cr(VI) por parte de cultivos puros como mixtos en sistemas en lote. Los valores corresponden a los mejores rendimientos obtenidos en fase estacionaria de crecimiento.**

| Cepa | % Eliminación de Cr(VI) |
|---|---|
| *Klebsiella oxytoca* P2 | 74,32 |
| *Klebsiella ornithinolytica* 1P | 65,01 |
| *Ralstonia taiwanensis* M2 | 48,31 |
| *Pseudomonas veronii* 2E | 44,47 |
| *Delftia acidovorans* AR | 38,83 |
| *Klebsiella ornithinolytica* 1P + *Pseudomonas veronii* 2E | 72,88 |
| *Pseudomonas veronii* 2E + *Klebsiella oxytoca* P2 | 59,82 |
| *Klebsiella ornithinolytica* 1P + *Klebsiella oxytoca* P2 | 65,65 |
| *Klebsiella ornithinolytica* 1P + *Pseudomonas veronii* 2E + *Klebsiella oxytoca* P2 | 54,67 |

Los mayores porcentajes de remoción de Cr(VI) se obtuvieron con *Klebsiella oxytoca* P2 y con el cultivo mixto *Klebsiella ornithinolytica* 1P + *Pseudomonas veronii* 2E. Estas dos últimas cepas en forma conjunta mejoraron notablemente el rendimiento en la biotransformación. Si bien estos cultivos demostraron una reducción de Cr(VI), en ningún momento se observó la precipitación de compuestos insolubles de Cr(III), a pesar de obtener un pH=8 en todos los casos. Las mediciones de cromo total realizadas por espectroscopia de absorción atómica demostraron que todo el Cr(III) permanecía en solución por lo que se ensayaron métodos de floculación con diferentes agentes. Con la utilización de $Na_2CO_3$ 0,1 M se logró una precipitación prácticamente cuantitativa del Cr(III) en solución.

**Movilidad Bacteriana**

De acuerdo al entorno celular, las bacterias pueden experimentar diferentes tipos de movilidades, modificándolas a su beneficio. En los medios líquidos o semi-sólidos de baja densidad, cierto grupo de bacterias son capaces de desplazarse libremente por medio de un apéndice denominado flagelo. El desplazamiento en este tipo de medios es denominado *swimming*. Cuando un grupo de bacterias coloniza un ambiente terrestre o que presenta restricciones para su movilidad, no puede propagarse a través del mismo por *swimming*. En dichos casos, el desplazamiento se produce por un proceso denominado *swarming*. El *swarming* se suele describir como una forma de movilidad rápida, grupal y coordinada que depende de dos factores fundamentales: el contacto constante célula-célula y la síntesis de una nueva batería de flagelos a lo largo de toda la superficie celular. La quimiotaxis es la movilidad dirigida hacia un posible sustrato o en contra de un compuesto con efecto negativo para los microorganismos.

Los tres tipos de movilidad son importantes durante la formación de biopelículas y pueden ser afectados por cambios en el medio. Como la formación de biopelículas es fundamental en el diseño de biorreactores de lecho fijo o fluidizado, la presencia de metales en los efluentes a tratar puede afectar el desarrollo adecuado de la película microbiana. Se estudió entonces la influencia de los metales Cd(II), Zn(II), Cu(II) y Cr(VI) sobre los distintos tipos de movilidad observada para las bacterias móviles *Ralstonia taiwanensis* M2, *Pseudomonas veronii* 2E y *Delftia acidovorans* AR. El ensayo de *swimming* se realizó en medio de cultivo PYG (peptona de caseína 2,5 g/L, extracto de levadura 1,25 g/L y glucosa 0,5 g/L) adicionado con 3 g/L de agar y se inoculó por punción en tubos con diferentes concentraciones de cada metal. Un resultado *swimming* positivo consistió en una distribución homogénea de la población bacteriana en todo el medio. El ensayo de *swarming* se realizó por punción central en placa con medio de cultivo nutritivo con el agregado de 4g/L de agar. La movilidad tipo *swarming* se verificó por el agrandamiento en dirección radial del desarrollo bacteriano a lo largo del tiempo de incubación. El ensayo de quimiotaxis fue una adaptación del *chemical in plug* colocando en placas una gota central con el quimioefector en agarosa 0,5% y alrededor una suspensión bacteriana en agarosa 0,35%. La aglomeración microbiana en torno a la gota central evidenció una quimiotaxis positiva, mientras que una disminución de la concentración bacteriana alrededor de la gota central fue provocada por una quimiotaxis negativa. Los resultados obtenidos fueron variados ya que cada cepa respondió de manera diferente. En la Figura 3 se ejemplifican algunos de ellos.

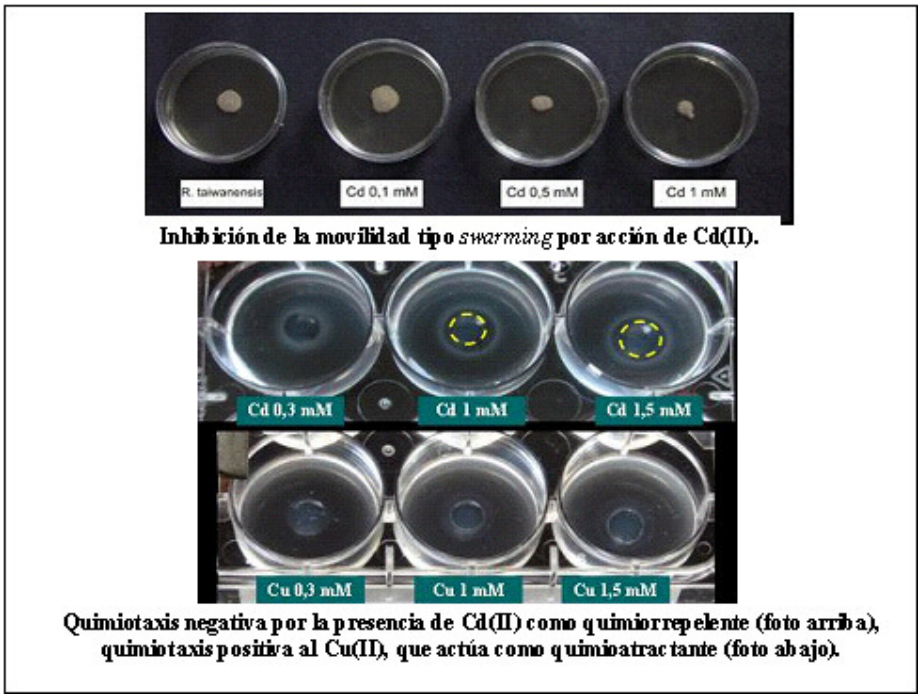


**Figura 3. Acción de los metales sobre la movilidad de *Ralstonia taiwanensis* M2.**

**INTERACCIONES BACTERIA-BACTERIA**

El desarrollo de cultivos mixtos sólo es posible si las bacterias logran crecer en forma conjunta a lo largo de todo un cultivo en lote. Es por ello que primeramente se evaluó la posibilidad de que las bacterias liberaran alguna actividad antimicrobiana. Como se ve en la Figura 4, tanto *Ralstonia taiwanensis* M2 como *Delftia acidovorans* AR la poseen, tal como lo revelan sus respectivos halos de inhibición alrededor de sus colonias.

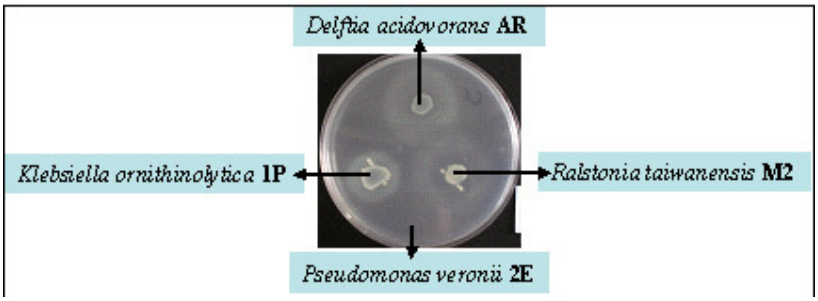


**Figura 4. Ensayo de actividad antimicrobiana sobre *Pseudomonas* veronii 2E.**

Para efectuar un seguimiento de la composición de un cultivo mixto se efectuó una Electroforesis en Gradiente de Gel Desnaturalizante (DGGE, Muyzer, 1993) del ADN bacteriano, extraído a partir de muestras pertenecientes a diferentes estadios de los diferentes

cultivos mixtos. Los resultados obtenidos fueron claros: sólo pudieron coexistir *Klebsiella ornithinolytica* 1P y *Pseudomonas veronii* 2E, el par que demostró un pronunciado incremento en la eliminación de Cr(VI) (Tabla1). En los demás casos se vio una clara predominancia de *Klebsiella oxytoca* P2 sobre las demás bacterias, no pudiendo mejorar los rendimientos obtenidos en cuanto a la biotransformación de Cr(VI).

**INTERACCIONES BACTERIA-SUPERFICIES**

La posibilidad de generar biopelículas está determinada por la capacidad que posee una determinada bacteria de interactuar con superficies que pueden actuar como soporte. Superficies poliméricas (siliconas, teflón, poliuretanos, etc.; Vullo, 2008) y vidrio son ejemplos de matrices a ensayar para la utilización de las mismas en biorreactores. La Figura 5 muestra una visión microscópica del desarrollo bacteriano sobre las matrices ensayadas. Las bacterias aisladas se adhieren a una diversidad de superficies, esto posibilita la inmovilización de los microorganismos para usos en biotratamientos.

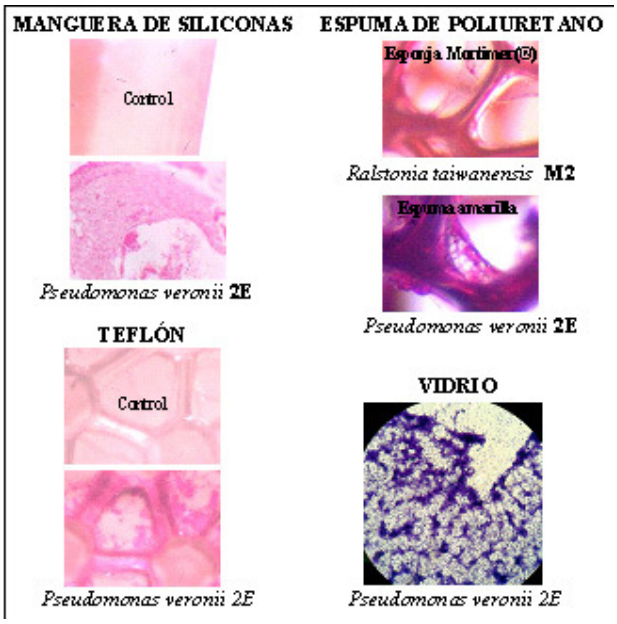


**Figura 5. Películas microbianas en diferentes matrices, vistas con un aumento de 100x.**

**INTERACCIONES METAL-ENTORNO**

La biodisponibilidad es un factor a tener en cuenta a la hora de evaluar interacciones metal-microorganismos. Está determinada por la capacidad de asociación del catión metálico con componentes del entorno celular, que pueden ser solubles o asociados a partículas en suspensión. Considerando el material soluble, la capacidad complejante de ciertas sustancias orgánicas puede traer como consecuencia una disminución en la concentración de metal libre en solución. Tanto en efluentes industriales como en medios de cultivo existen variedades de sustancias con grupos funcionales disponibles que pueden actuar como complejantes. La

evaluación de la capacidad complejante tanto del medio de cultivo como del efluente a tratar es indispensable y determinante de la eficiencia global del biotratamiento.

¿Cómo se mide la capacidad complejante de un sistema acuoso? La técnica es la Voltametría de Preconcentración Electrolítica de Onda Cuadrada, mediante la cual se realiza una titulación del sistema por agregados crecientes de una solución del metal de interés. En la Figura 6 se muestra un gráfico representando la titulación del medio de cultivo utilizado para el desarrollo de nuestras bacterias (PYG: peptona de caseína 2,5 g/L, extracto de levadura 1,25 g/L y glucosa 0,5 g/L). Se graficó la corriente de pico Ip en función de la concentración de Cd(II) total agregado. Se ven dos curvas: 1) la correspondiente a los puntos con círculo abierto es la titulación control en un entorno sin capacidad complejante, que corresponde a una recta ya que la concentración de metal es directamente proporcional a la corriente detectada en el instrumental y 2) la correspondiente a puntos con círculos cerrados: no es un gráfico lineal en este caso ya que los primeros puntos poseen una tendencia diferente a los cuatro últimos. Marcando la recta para el caso 1) vemos que su origen es el (0,0), lo cual es lógico ya que la corriente registrada es nula cuando la concentración de Cd(II) = 0. Tomando los últimos cuatro puntos del caso 2), y trazando la recta a la que aproximan, se puede extrapolar la misma al eje x, cortándolo en un valor de concentración de Cd(II) cercano a 1 µM. ¿Qué quiere decir esto? Que en el medio de cultivo ensayado existen ligandos que complejan el Cd(II) agregado en una concentración de 1 µM, suponiendo una estequiometría metal-ligando 1:1. El Cd(II) disponible genera una señal de corriente de pico Ip correspondiente a una menor concentración que la agregada, con lo cual parte del Cd(II) agregado se encuentra en una situación de equilibrio de complejamiento con componentes del medio de cultivo que no permiten su detección. La linealizaciones de Ruzic y Scatchard (gráficos insertos en la Figura 6) contribuyen al cálculo de constantes de estabilidad de los complejos.

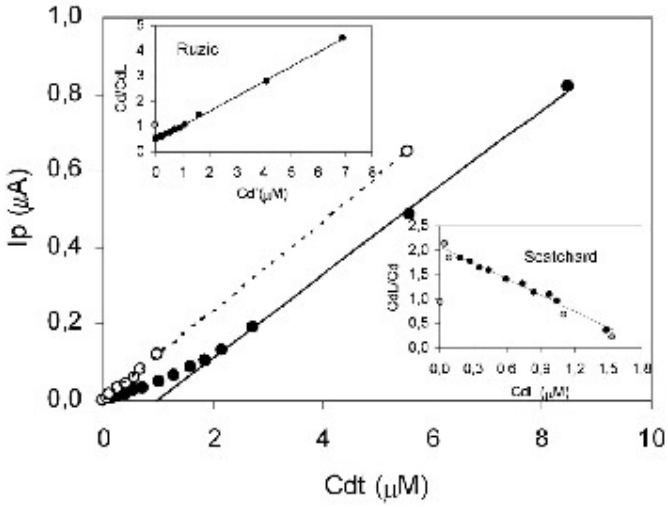


**Figura 6. Titulación del medio de cultivo PYG con solución de Cd(II) para la determinación de la capacidad complejante.**

**CONCLUSIONES: PRESENTE Y FUTURO**

Gracias a los estudios realizados y como conclusión global en cuanto a las interacciones metal-microorganismos, microorganismo-superficies, microorganismo-microorganismo y metal-entorno, hemos podido avanzar en el diseño de biorreactores sobre lecho fijo para Cd(II) y Zn(II). En la Figura 7 vemos dos reactores en funcionamiento cuyos volúmenes de trabajo son 50 mL (C50) y 200 mL (C200). Hemos tenido resultados preliminares de un 50% de retención de Cd(II) y Zn(II) en efluentes artificiales, situación que aún podemos mejorar, antes de trabajar con efluentes industriales reales, para luego efectuar una ampliación de escala de trabajo.

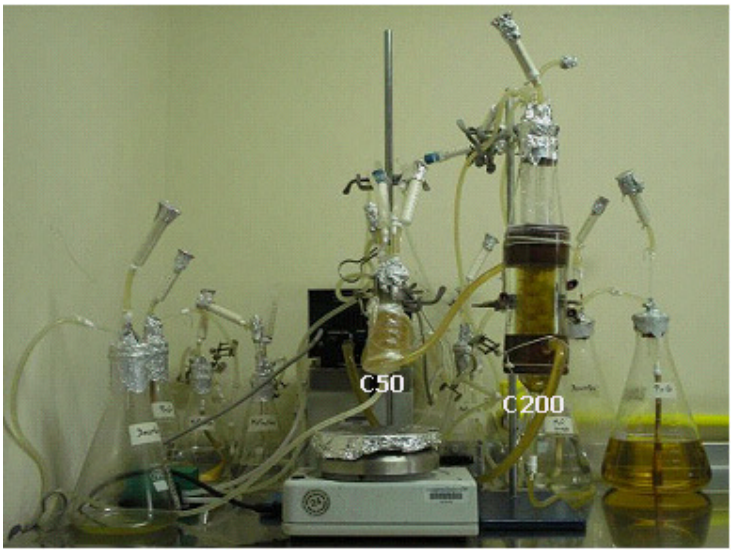


**Figura 7. Biorreactores de laboratorio en funcionamiento para la retención de Cd(II) y/o Zn(II).**

¿Cuáles son las actividades programadas en un futuro cercano? Haciendo un listado, podemos resumirlas así:

- Mejoramiento del funcionamiento de biorreactores de lecho fijo.
- Estudios de formación de biopelículas en diversos materiales para utilizar como lechos.
- Ensayar la retención de cationes en biorreactores utilizando efluentes artificiales de mezclas que contienen Cd(II) y Zn(II).
- Determinar la capacidad complejante de efluentes de galvanoplastías.
- Probar el funcionamiento de los biorreactores con efluentes industriales.
- Determinar la presencia de actividad cromato-reductasa en las bacterias que demostraron la capacidad de eliminar Cr(VI).
- Desarrollar un biorreactor con células en suspensión para Cr(VI) acoplado con precipitación química.
- Profundizar los estudios en comunicación célula-célula: quorum sensing y la influencia de los metales sobre este fenómeno.

Es claro que queda mucho por delante, pero nos encaminamos hacia el desarrollo de tecnologías innovadoras aplicables en la prevención de la contaminación. El tratamiento adecuado de los efluentes industriales, previo a su descarga en cursos de agua, es imprescindible para el resguardo la calidad del recurso.

**AGRADECIMIENTOS**

El proyecto es financiado por la Universidad Nacional de General Sarmiento y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, PICTO-UNGS 36782-341). Agradecemos al Lic. Aldo Collauti (Centro de Desarrollo Analítico, Buenos Aires) por las determinaciones de cromo total.

Agradecemos especialmente a las instituciones nacionales que hicieron posible el trabajo de los becarios: María Alejandra Daniel (ANPCyT), Luciana Garavaglia y Griselda Sosa (UNGS) y Matías Barrionuevo (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, CIC).

**REFERENCIAS**

**Ahluwalia, S.S. y Goyal, D., 2007.** Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. Bioresource Technology, 98(12): 2243-2257

**American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation**. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, Washington, D. C., 1998.

**Asatiani, N. y Holman, H., 2004.** Effect of chromium (VI) action on Arthrobacter oxydans. Current Microbiology 49:321-326.

**Bender, J. y Phillips, P., 2004**. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. Bioresource Technology, 94: 229-238.

**Bingol, A., Handan, U., Bayhan, Y.K., Karagunduz, A., Cakici, A. y Keskinler, B., 2004.** Removal of chromate anions from aqueous stream by a cationic surfactant-modified yeast, Bioresource Technology 94: 245-249.

**Borrok, D.M. y Fein, J.B. 2005.** The impact of ionic strength on the adsorption of protons, Pb, Cd and Sr onto surfaces of Gram negative bacteria: testing non-electrostatic diffuse and triple monolayer models. Journal of Colloid Interface Science 286: 110-126.

**Caiazza, N., Merrit, J., Brothers, K. y O´Toole, G.A., 2007.** Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14, Journal of Bacteriology, 189(9): 3603-3612.

**Ceretti, H.M., Vullo, D.L., Zalts, A. y Ramírez S.A., 2006.** Cadmium complexation in culture media. Electroanalysis 18(5): 493-498.

**Chirwa, E.M.N. y Wang, Y., 1997.** Hexavalent Chromium Reduction by *Bacillus sp*. In a Packed-Bed Bioreactor. Environmental Science and Technology 31: 1446-1451.

**Demir, A., y Arisoy, M., 2007.** Biological and chemical removal of Cr(VI) from waste water: cost and benefit analysis, Journal of Hazardous Materials 147:275-280.

**Deng, S y Ting, Y.P., 2005.** Polyethylenimine-modified fungal biomass as a high capacity biosorbent for Cr(VI) anions: sorption capacity and uptake mechanisms, Environmental Science and Technology 39: 8490-8496.

**Diels, L., Spaans, P.H., Van Roy, S., Hooyberghs, L., Ryngaert, A., Wouters, H., Walter, E., Winters, J., Macaskie, L., Finlay, J., Pernfuss, B., Woebking, H., Pümpel, T. y Tsezos, M., 2003.** Heavy metals removal by sand filters inoculated with metal sorbing and precipitating bacteria. Hydrometallurgy 71: 235-241.

**Duffus, J.H., 2002**. "Heavy metals" – a meaningless term?, IUPAC technical report, Pure and Applied Chemistry, 74(5): 793-807.

**Eboigbodin, K.E., Newton, J.R.A., Routh, A.F. y Biggs, C.A., 2006.** Bacterial quorum sensing and cell surface electrokinetic properties, Applied Microbial and Cell Physiology, 73: 669-675.

**Gadd, G.M., 2000.** Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. Current Opinion in Biotechnology 11: 271-279.

**Garavaglia, L., Cerdeira, S. y Vullo, D.L., 2009.** Chromium (VI) biotransformation by b- and g-Proteobacteria from natural polluted environments: a combined biological and chemical treatment for industrial wastes. Enviado para su publicación.

**Guibaud, G., van Hullebusch, Bordas, F., d´Abzac, P. y Joussein, E., 2009.** Sorption of Cd(II) and Pb(II) by exopolymeric substances (EPS) extracted from activated sludges and pure bacterial strains: Modeling of the metal/ligand ratio effect an role of the mineral fraction. Bioresource Technology, 100: 2959-2968.

**Kato, J., Kim, HE, Takiguchi, N., Kuroda, A. y Ohtake, H., 2008.** *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem, Journal of Bioscience and Bioengineering, 106(1): 1-7.

**Konovalova, V., Dmytrenko, G.M., Nigmatullin, R.R., Bryk, M.T. y Gvozdyak, P., 2003.** Chromium(VI) reduction in a membrane bioreactor with immobilized *Pseudomonas* cells. Enzyme and Microbial Technology 33: 899-907.

**Lim, P.E., Mak, K.Y., Mohamed, N. y Noor, A.M., 2003.** Removal and speciation of heavy metals along the treatment path of wastewater in subsurface-flow constructed wetlands. Water Science and Technology, 48(5): 307-313

**Lovley, D.R., (ed.) 2000**. Environmental Microbe-Metal Interactions, American Society for Microbiology, Washington D.C.

**Lu W.B., Shi J.J., Wang C.H. y Chang J.S., 2006.** Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate Enterobacter sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. Journal of Hazardous Materials, 134(1-3): 80-86.

**Malik, A., 2004**. Metal bioremediation through growing cells. Environment International, 30: 261-278.

**Megharaj, M., Avundainayagam, S. y Naidu, R., 2003**. Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. Current Microbiology 47: 51-54.

**Méndez, N., Ramírez, S., Ceretti, H., Zalts, A., Candal, R. y Vullo, D.L., 2009.** *Pseudomonas veronii* 2E surface interactions with Zn(II) and Cd(II), en redacción.

**Muyzer, G., De Waal, E. y Uitterlinden, A., 1993.** Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA, Applied and Environmental Microbiology, 59: 695 – 700

**Nkhalambayausi-Chirwa, E.M. y Wang, Y., 2001.** Simultaneous chromium (VI) reduction and phenol degradation in a fixed-film coculture bioreactor: reactor performance. Water Research 35(8): 1921-1932.

**Pal, A. y Paul, A.K., 2008.** Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. Indian Journal of Microbiology, 48: 49-64.

**Pandey, G. y Jain, R.K., 2002**. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation, Applied and Environmental Microbiology, 68(12): 5789-5795.

**Perumbakkam, S., Hess, T.F. y Crawford, R.L., 2006.** A bioremediation approach using natural transformation in pure-culture and mixed-population biofilms. Biodegradation 17: 545-557.

**Polti, M. , Amoroso, M. y Abate, C, 2007.** Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments, Chemosphere 67: 660-667.

**Singh, R., Paul, D. y Jain, R.K., 2006.** Biofilms: Implications in bioremediation, Trends in Microbiology, 14(9):389-397.

**Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y. y Madamwar, D., 2007.** Reduction of chromate by cell-free extract by *Brucella sp*. Isolated from Cr(VI) contaminated sites. Bioresource Technology 98:1541-1547.

**Tsuneda, S. Aikawa, H., Hayashi, H. y Hirata, A., 2004.** Significance of cell electrokinetic properties determined by soft-particle analysis in bacterial adhesion onto a solid phase, Journal of Colloid and Interface Science, 279: 410-417.

**Valls, M. y de Lorenzo, V., 2002.** Exploiting the genetic and the biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. FEMS Microbiology Reviews 26:327-338.

**van Veen, E., Burton, N., Comber, S. y Gardner, M., 2002.** Speciation of copper in sewage effluents and its toxicity to *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 21: 275-280.

**Vijayaraghavan K, Jegan J, Palanivelu K. y Velan M., 2005.** Biosorption of copper, cobalt and nickel by marine green alga Ulva reticulata in a packed column. Chemosphere. 60(3):419-26.

**Vullo, D., Ceretti, H., Daniel, M.A., Ramírez, S. y Zalts, A., 2008**. Copper, cadmium and zinc biosorption by *Pseudomonas veronii* 2E, Bioresource Technology 99: 5574-5581.

**Zoubolis, A.I., Loukidou, M.X. y Matis, K.A., 2004.** Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. Process Biochemistry, 39: 909-916.

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

*Revista **QuímicaViva***

*Número 2, año 8, Agosto de 2009*

*quimicaviva@qb.fcen.uba.ar*

ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

# Metabolitos de interés biotecnológico *à la carte*: Análisis de flujos metabólicos como herramienta para la evaluación de fenotipos industriales

Pablo I. Nikel[a,b]

[a] Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín, Colectora Av. General Paz 5445, B1650KNA, INTI - Ed. 24, San Martín, Buenos Aires, Argentina
[b] Departamento de Química Biológica, Universidad de Buenos Aires, Av. Intendente Güiraldes 2160, C1428EGA, Ciudad de Buenos Aires, Argentina
*E-mail*: Pablo@qb.fcen.uba.ar

Recibido el 20/07/09
Aceptado el 03/08/09

**Resumen**

La versatilidad del metabolismo microbiano ofrece la posibilidad de obtener una gran variedad de metabolitos de interés biotecnológico. Para el desarrollo racional de bioprocesos destinados a la obtención de dichos metabolitos es necesario contar con herramientas de análisis global que permitan el estudio holístico del metabolismo. El análisis de flujos metabólicos basado en marcación con sustratos que contienen $^{13}C$ se ha convertido en una importante herramienta de análisis aplicada en Ingeniería Metabólica, y permite la cuantificación de los flujos intracelulares del metabolismo central de un microorganismo proveyendo una visión completa del mismo. El conjunto de metodologías utilizadas para este tipo de análisis ha evolucionado considerablemente en los últimos años y la introducción de nuevas técnicas ha permitido la implementación de análisis de flujos metabólicos en períodos de tiempo relativamente cortos. En esta actualización se resumen algunas de las aplicaciones recientemente descriptas en la bibliografía para el análisis de flujos metabólicos relacionado al estudio y optimización de bioprocesos industriales. El texto concluye con una perspectiva de desarrollos futuros.

*Palabras clave:* Análisis de flujos metabólicos; Ingeniería Metabólica; metabolitos de interés industrial; experimentos de marcación con carbono; isotopómero; cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

# Metabolites of biotechnological interest *à la carte*: Metabolic flux analysis as a tool for industrial phenotypes evaluation

**Abstract**

Microbial metabolism is highly versatile, and offers the possibility to obtain a wide range of biotechnological metabolites. In order to design bioprocesses rationally to obtain such metabolites, it is necessary to apply tools for global analysis, which give a holistic view of the metabolism. Metabolic flux analysis based on labeling with $^{13}C$-substrates has become an important tool in Metabolic Engineering, and allows the quantification of metabolic fluxes thus providing a whole picture of the central microbial metabolism. The methodologies involved in this kind of analysis have evolved considerably during the last few years, and the introduction of new techniques enables the implementation of accurate metabolic flux analysis with shortened experimental time. In this work, a number of recently-published applications of metabolic flux analysis on industrial bioprocesses study and optimization is shortly reviewed and discussed. An outlook to possible future developments concludes the text.

*Keywords:* Metabolic flux analysis; Metabolic Engineering; metabolites of industrial interest; carbon labeling experiments; isotopomer; gas chromatography couple to mass spectrometry

**Introducción**

La redundancia de enzimas individuales y de caminos metabólicos completos en numerosas especies bacterianas es una indicación inequívoca de la naturaleza altamente flexible del metabolismo microbiano (25). Dado que estas vías metabólicas son activas solamente bajo ciertas condiciones específicas, en cada ambiente o condición de crecimiento opera una determinada distribución de flujos metabólicos que permite a la célula acoplar la generación de energía y el catabolismo de la fuente de carbono con los requerimientos anabólicos para alcanzar un crecimiento óptimo. Por este motivo, conocer, identificar, y, consecuentemente, manipular las vías metabólicas activas en distintas condiciones de crecimiento es un requerimiento esencial para el diseño de bioprocesos destinados a la obtención biotecnológica de productos derivados del metabolismo microbiano.

La **Ingeniería Metabólica** comprende una serie de metodologías pertenecientes a diversas disciplinas y podría definirse, *sensu lato*, como la mejora racional y dirigida de la formación de un producto, o una propiedad celular, a través de la modificación de reacciones bioquímicas del microorganismo, o introduciendo nuevas rutas biosintéticas. El **análisis de flujos metabólicos** (AFM) se ha convertido en las últimas décadas en una de las herramientas más relevantes en Ingeniería Metabólica. El principal objetivo del AFM es la cuantificación detallada de todos los flujos metabólicos del metabolismo central en un organismo. El resultado final de un estudio de este tipo es, por lo tanto, un mapa de reacciones bioquímicas que muestra la distribución de flujos anabólicos y catabólicos en el contexto de una red de reacciones bioquímicas. Además de tratarse de una herramienta de gran importancia para el análisis fisiológico (41), surge en forma evidente la posibilidad de identificar (y modificar) reacciones para la obtención de uno o varios metabolitos a través de AFM.

En esta actualización se discuten brevemente las metodologías de análisis fenotípico global basadas en interpretación de flujos metabólicos (por cálculo estequiométrico directo y por marcación isotópica), y se exponen algunos ejemplos de la aplicación de estas metodologías en bioprocesos de interés industrial.

**Análisis estequiométrico de flujos metabólicos**

Esta metodología, establecida por Varma y Palsson en los años 90 para la interpretación del metabolismo central de *Escherichia coli* (38), hace uso del conocimiento de la estequiometría en cada una de las reacciones de una red metabólica determinada para la estimación de flujos. Una de las restricciones más importantes en este tipo de análisis es que el sistema debe encontrarse en un estado estacionario o *cuasi*-estacionario (esto es, la concentración intracelular de cada metabolito, y consecuentemente el flujo asociado al mismo, debe ser constante mientras dure el experimento). Estas condiciones pueden ser fácilmente establecidas en un cultivo continuo que ha alcanzado el estado de equilibrio estacionario y, con ciertas restricciones, durante la fase exponencial de un cultivo en lote o en un cultivo en lote alimentado (esto es, *fed-batch*) si la variación en el flujo de alimentación durante el experimento

es pequeña. Para cualquiera de estas condiciones de equilibrio estacionario, la suma de los flujos 'de entrada' para cada metabolito iguala a la suma de los flujos 'de salida' (en otras palabras, no existe acumulación neta del metabolito). Esta situación puede describirse matemáticamente con una única ecuación lineal para cada metabolito considerado, procedimiento que colectivamente se denomina **balance de masas**. La Fig. 1a ilustra este concepto a partir de una red bioquímica sencilla, en donde puede observarse que existen flujos intracelulares y extracelulares.

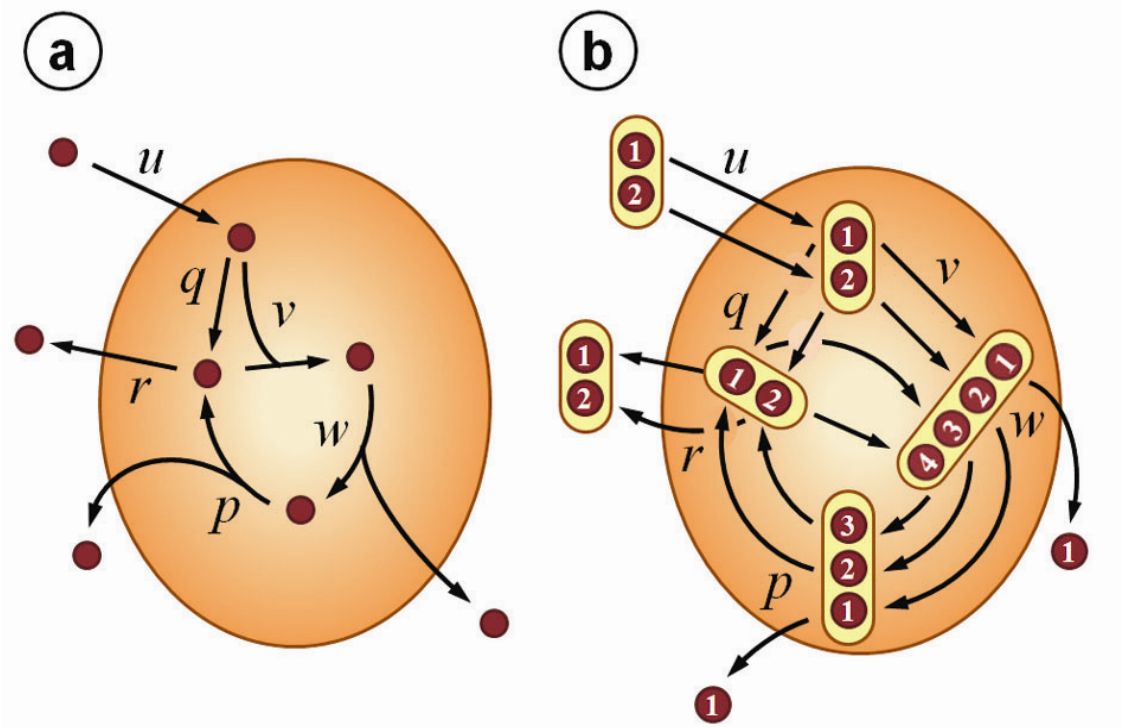


**Fig. 1.** Ejemplo de un diagrama de flujos para una red bioquímica sencilla. *a*) Los flujos $u$, $r$, y $p$ pueden ser determinados directamente mediante la estimación de la velocidad de consumo de sustrato y de producción de metabolitos extracelulares, respectivamente. A partir de la medición de al menos dos de estos flujos puede deducirse el valor de todos los flujos restantes. *b*) Para el AFM basado en marcación isotópica es necesario conocer el destino de cada uno de los átomos de carbono en los metabolitos de la red considerada con el objetivo de determinar el enriquecimiento posicional en el isótopo considerado (*e.g.*, $^{13}C$).

En este caso, asumiendo que el sistema se encuentra en estado de equilibrio estacionario, se obtiene el siguiente conjunto de relaciones lineales:

$u = q + v$ $\quad v = w$ $\quad w = p$ $\quad p + q = r + v$

Es decir, existen cuatro relaciones lineales para seis variables de flujo. Esto significa que **todos** los patrones de flujo posibles en esta red bioquímica forman un sub-espacio bidimensional (lineal) dentro del espacio hexadimensional que forman las seis variables de

flujo. Dado que en la mayoría de los casos prácticos la medición directa de los flujos intracelulares no es posible, normalmente se utilizan modelos matemáticos que permiten inferir dichos flujos intracelulares a partir de otros que pueden ser medidos con mayor facilidad. De esta manera, si se pudiesen medir directamente al menos dos de los seis flujos considerados en el ejemplo de la Fig. 1a, el sistema de ecuaciones se convertiría en un sistema determinado (en cuyo caso se puede deducir el valor de los seis flujos a partir de la medición de dos de ellos). Los flujos extracelulares (*ejemplo:* velocidad de consumo de sustrato, velocidad de síntesis de metabolitos extracelulares, evolución de $CO_2$, etc.) usualmente se utilizan como datos para el cálculo de todos los flujos restantes. Para el ejemplo que se está analizando, supongamos que se pueden medir los flujos extracelulares *u* y *r*. Entonces,

$$v = u - r \qquad w = u - r \qquad p = u - r \qquad q = r$$

El resultado final es un mapa de flujos metabólicos que representa gráficamente cada una de las reacciones bioquímicas incluidas en el modelo junto a una estimación de la velocidad en condiciones de estado estacionario (*viz*., flujo) a la cual cada reacción tiene lugar. Este procedimiento sencillo condujo a la primera publicación, a principio de los años 90, describiendo el metabolismo central de *Corynebacterium glutamicum* (36), una bacteria tradicionalmente utilizada para la obtención industrial de aminoácidos.

**Experimentos de marcación isotópica**

A pesar de la relativa sencillez de su implementación, desafortunadamente existen numerosas limitaciones para la interpretación estrictamente estequiométrica de los flujos metabólicos en un microorganismo. Algunas de ellas son:

*a*) existencia de vías metabólicas paralelas, que conducen al mismo metabolito pero utilizando (iso)enzimas e intermediarios diferentes. Un caso típico es la presencia de dos vías enzimáticas independientes para la síntesis de lisina por *C. glutamicum* (15),

*b*) presencia de ciclos metabólicos en los cuales no se puede medir directamente al menos un flujo interno en el ciclo,

*c*) existencia de vías metabólicas bidireccionales que operan al mismo tiempo en ambos sentidos. Este es el caso para la enorme mayoría de las reacciones bioquímicas de una célula. De hecho, solamente pueden considerarse como unidireccionales aquellas reacciones cuya reversibilidad esté fuertemente impedida desde el punto de vista termodinámico. Un ejemplo particular de esta situación es el caso de las reacciones altamente reversibles catalizadas por las enzimas transaldolasa y transcetolasa en la vía de pentosas fosfato, y

*d*) dificultades en el balance de co-factores. En una red metabólica típica, que normalmente consta de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas, vía de pentosas fosfato, ciclo de ácidos tricarboxílicos, y reacciones anapleróticas, solamente se pueden determinar estequiométricamente los flujos asumiendo que la síntesis y el consumo de metabolitos asociados al balance energético y balance redox (*e.g*., ATP, ADP, NADH, $NAD^+$, etc.) se encuentran perfectamente balanceados. Sin embargo, la evidencia experimental sugiere que

existen numerosos ciclos fútiles, y que la conversión energética de equivalentes de reducción, como NADH y NADPH, a ATP no es constante incluso para el mismo microorganismo en condiciones de cultivo similares (26).

Estas limitaciones pueden ser evitadas, al menos parcialmente, utilizado un sustrato isotópicamente marcado para el experimento de AFM, tal como $^{13}$C- o $^{14}$C-glucosa. La utilización de $^{14}$C-glucosa se implementó en AFM en los años 80 (3), pero pronto fue desplazada por estrategias de marcación isotópica no radioactiva en lo que genéricamente se denomina **experimentos de marcación con carbono**. En este tipo de experimentos, el sistema biológico se alimenta con el sustrato marcado, y los átomos de éste se distribuyen entre los metabolitos de la red bioquímica hasta que en condiciones de equilibrio estacionario los átomos de $^{13}$C/$^{14}$C se encuentran en estado de equilibrio isotópico (17). En este punto, el enriquecimiento isotópico de cada uno de los metabolitos en la red puede determinarse empleando técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) (31) o espectrometría de masas (EM) (5, 7, 44). El proceso descripto permite la identificación de cada uno de los metabolitos en la red y evita la mayoría de las complicaciones asociadas al análisis puramente estequiométrico dado que se conoce el destino de las moléculas marcadas y se puede seguir su 'trayectoria' intra y extracelular. En el contexto de este tipo de análisis surgen algunos términos específicamente asociados a los experimentos de marcación con carbono en los que se basa la técnica de $^{13}$C-AFM. Por ejemplo, **isotopómero** es un término derivado de isótopo e isómero, e identifica a cada uno de los posibles estados de marcación en los que puede encontrarse una molécula de un determinado metabolito. Dado que un metabolito que contiene *n* átomos de carbono podrá contener un isótopo o un átomo en su estado isotópico natural en cada posición, el número de isotopómeros para ese metabolito está dado por $2^n$.

Uno de los requerimientos más importantes para la implementación de $^{13}$C-AFM es que se debe conocer exactamente el destino de cada uno de los átomos de carbono dentro de los metabolitos de la red considerada (41). La Fig. 1b ilustra esta situación para la red bioquímica sencilla considerada anteriormente. En este esquema puede apreciarse la complejidad de la transición entre los átomos de carbono en cada metabolito. A partir de esta red de transición de átomos de carbono se puede deducir la red de isotopómeros esperada. Esta red indica cómo los isotopómeros reaccionan entre sí dando lugar a nuevos metabolitos marcados.

Si bien existen numerosas metodologías para asociar la presencia de isotopómeros y la distribución de metabolitos dentro de la red bioquímica en estudio, la medición de metabolitos marcados normalmente se realiza utilizando cromatografía de gases (CG) acoplada a EM (5, 10). Dentro del conjunto de las numerosas biomoléculas que proveen información acerca del estado isotópico de intermediarios metabólicos, usualmente se utilizan los aminoácidos proteinogénicos. Esto implica que después de someter a la biomasa a hidrólisis ácida completa, los aminoácidos componentes de la misma deben ser derivatizados para convertirlos en moléculas volátiles y permitir su separación por CG (7). Los compuestos que se eluyen de la columna del cromatógrafo son ionizados, lo cual genera fragmentos con diferentes relaciones

*m*/*z* (masa/carga). Esta técnica es particularmente importante dado que no solamente puede determinarse la masa de los isotopómeros del ion molecular si no que además se analiza el espectro de masas de diferentes fragmentos del mismo isotopómero, lo cual aumenta y diversifica la información disponible acerca del metabolito analizado. Es preciso notar aquí que existen varias técnicas alternativas para la determinación de isotopómeros; como $^{1}$H-RMN y $^{13}$C-RMN, cromatografía líquida (CL) acoplada a EM, o MALDI-TOF* acoplado a EM (43).

* MALDI-TOF es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time-Of-Flight*.

**Evaluación *in silico* de experimentos de marcación isotópica y construcción del mapa de flujos**

A pesar de que el análisis de la distribución de isotopómeros utilizando modelos matemáticos es una metodología sumamente compleja, es necesario conocer los lineamientos generales en los que se fundamenta para comprender la forma en la que se evalúan los experimentos de marcación con carbono. Básicamente, la interpretación de los resultados se basa en simulaciones matemáticas (32). En una simulación de este tipo, en cada iteración se asume que se conocen los valores para los flujos en la red bioquímica estudiada. A partir de un conjunto limitado de flujos 'libres' (a los cuales se les asigna un valor arbitrario) y de la composición isotópica del sustrato carbonado se puede reconstruir la distribución de isotopómeros de cada metabolito en el estado de equilibrio estacionario. Para ello, el modelo matemático utilizado para correlacionar la distribución de isotopómeros y los flujos intracelulares contiene una ecuación (normalmente, no lineal) para cada uno de los isotopómeros en el sistema. Por lo tanto, para una red bioquímica 'mediana' que incluya solamente las vías metabólicas centrales, se tiene un sistema de alrededor de 1000 ecuaciones no lineales. La dimensión del sistema se relaciona con el hecho de que ciertas moléculas pueden tener numerosos isotopómeros derivados. Por ejemplo, solamente la molécula de corismato* tiene $2^{10}$ = 1024 isotopómeros asociados. Esto hace que los procesos de análisis isotopomérico y evaluación de flujos metabólicos requieran de herramientas informáticas adecuadas para el manejo de tal cantidad de datos y variables. Generalmente, los programas informáticos utilizados para la interpretación *in silico* de flujos metabólicos se basan en operaciones algebraicas con matrices (35).

*(Ácido corísmico) Es un intermedio clave en la síntesis del triptófano, la fenilalanina y la tirosina, es decir, en la síntesis de ácidos aromáticos, siendo el primer punto de ramificación, con una rama que conduce a triptófano, otra que conduce a la fenilalanina y otra a la tirosina.

Una vez establecido un procedimiento para la simulación de la marcación isotópica, la estrategia para la determinación y evaluación de flujos (Fig. 2) normalmente incluye los siguientes pasos:

*a*) asignación arbitraria de algunos valores de flujos al sistema de modo tal que se cumplan las restricciones estequiométricas de las reacciones bioquímicas del modelo,
*b*) simulación de la distribución isotópica de los metabolitos en la red bioquímica, la cual debe estar de acuerdo con las restricciones estequiométricas mencionadas en *a*),
*c*) comparación del patrón de marcación isotópica y los valores de flujo obtenidos durante la simulación con los valores experimentales obtenidos por CG-EM,
*d*) repetición iterativa del procedimiento a través de un algoritmo de optimización apropiado (42), de modo tal que la diferencia entre la distribución *in silico* y la distribución experimental sea mínima, y
*e*) análisis estadístico de los resultados, en virtud de que la propagación de errores de los parámetros biológicos observables (*e.g.*, distribución isotópica, flujos extracelulares, evolución de $CO_2$, etc.) al mapa de flujos puede originar resultados precisos pero estadísticamente erróneos o inválidos (37).

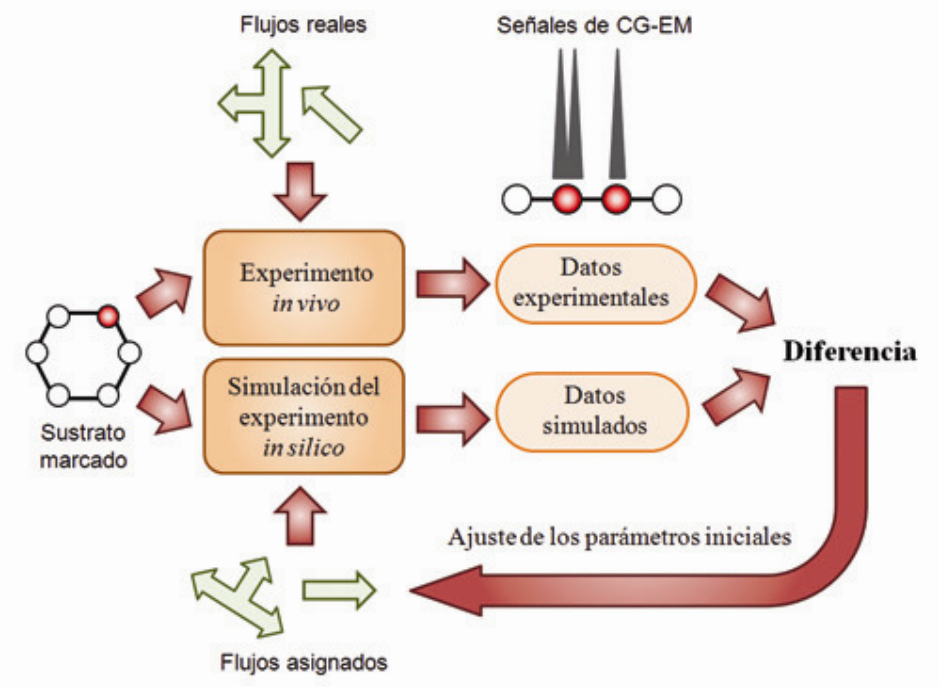


**Fig. 2.** Esquema del procedimiento para la obtención del mapa de flujos metabólicos a partir de experimentos de marcación con carbono seguidos de integración *in silico* de los datos experimentales. En cada iteración, el patrón espectroscópico de fragmentos de isotopómeros generado a partir de un conjunto de flujos cuyos valores se asignan arbitrariamente se compara con los valores experimentales. La secuencia de iteraciones se repite hasta minimizar la

diferencia entre ambos conjuntos de valores. CG-EM, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa.

Para ilustrar la importancia de la determinación de flujos metabólicos por marcación con sustratos isotópicos, consideremos la secuencia metabólica sencilla que muestra la Fig. 3a. En esta red, el metabolito **A** es utilizado como sustrato por dos vías enzimáticas que operan con velocidades netas $v_1$ y $v_2$. Si pudiese medirse la velocidad de consumo de **A** y la velocidad de secreción de **F** y **G** (asumiendo que estos metabolitos fuesen excretados al medio extracelular), se podría analizar la distribución de flujos en los puntos de ramificación a nivel de los metabolitos **D** y **H**, y se podría derivar matemáticamente la velocidad de síntesis del metabolito **K**. Sin embargo, no sería posible estudiar la distribución de flujos en el ciclo metabólico **A** → **B** → **C** → **A** (*esto es:* no se pueden conocer los valores de $v_1$ y $v_2$). Por otra parte, si la reacción que convierte a **C** en **D** consta de más de un paso enzimático, la distribución de intermediarios de la vía no podría conocerse y necesariamente se debería simplificar la secuencia de reacciones a la forma **C** → 2**D**. Finalmente, y tal como lo ilustra la Fig. 3a, la conversión de **A** en **C** es reversible y no podría deducirse el grado de reversibilidad de la reacción a partir de AFM estequiométrico.

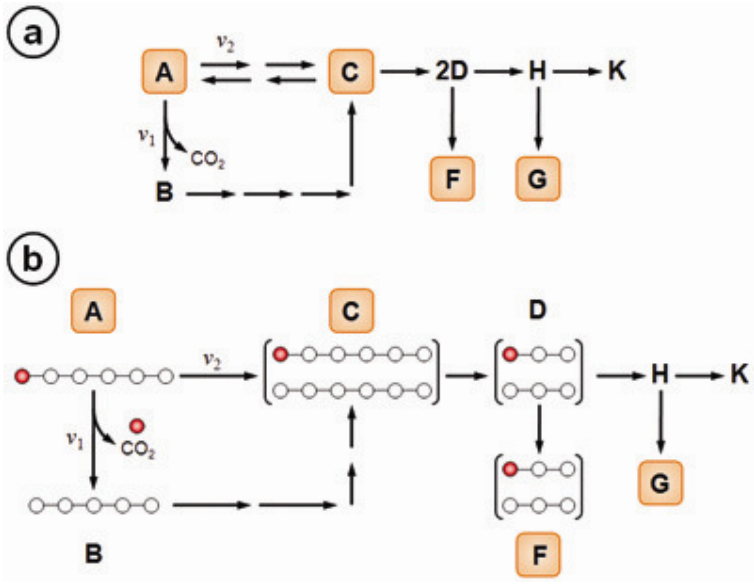


**Fig. 3.** Ejemplo hipotético de una red bioquímica sencilla incluyendo rutas enzimáticas lineales y ramificadas. *a*) La determinación de la velocidad de consumo del metabolito **A** y las velocidades de síntesis de los metabolitos **F** y **G** permite estimar los flujos para los metabolitos **D**, **H**, y **K**; pero no distingue los flujos en el ciclo metabólico caracterizado por $v_1$ y $v_2$. *b*) En un estudio de AFM basado en marcación isotópica el enriquecimiento posicional en el metabolito **C** permite distinguir si éste provino de **A** o **B**, y consecuentemente puede estimarse la contribución relativa de $v_1$ y $v_2$ a la velocidad de síntesis de **C**. Una situación análoga se verifica para los metabolitos **D** y **F**.

Consideremos ahora el estudio de la misma red bioquímica utilizando un sustrato isotópicamente marcado (Fig. 3b). En este caso, puede observarse que las reacciones

bioquímicas en la red generan asimetrías en la distribución de átomos de carbono. Dichas asimetrías pueden deducirse del análisis de isotopómeros y, por lo tanto, los metabolitos intermediarios pueden distinguirse unos de otros incluso cuando conduzcan a la formación de un único metabolito final. En el ejemplo de la figura, el metabolito **A** es una molécula de seis átomos de carbono cuya primera posición está ocupada por un átomo de $^{13}C$. La primera reacción, representada por el flujo $v_1$, consiste en una decarboxilación que origina una molécula del metabolito **B** sin marca isotópica. De esta manera, el patrón de marcación de la molécula **C** dependerá de si ésta se originó a partir de **A** (a través del flujo $v_1$, en cuyo caso se obtiene una molécula marcada) o a partir de **B** (a través del flujo $v_2$, en cuyo caso la molécula no contiene isótopos). De esta manera, el enriquecimiento isotópico del metabolito **C** (es decir, la cantidad de moléculas marcadas respecto de las que no contienen átomos de $^{13}C$) será directamente proporcional al cociente $v_2/v_1$. Esta relación también es cierta para los metabolitos **D** y **F**. El grado de enriquecimiento en $^{13}C$ en la primera posición del metabolito **F** (el cual, como se dijo, puede medirse en el medio extracelular) provee información acerca de la velocidad relativa del flujo $v_2$ y, en conjunción con otras mediciones de flujos y análisis estequiométrico, permite distinguir entre $v_1$ y $v_2$. Aunque arbitrario, este ejemplo esquemático guarda similitud con el catabolismo de una hexosa a través de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (que, en el ejemplo, estaría asociada al flujo caracterizado por $v_2$) y la rama oxidativa de la vía de pentosas fosfato (en el ejemplo, representada por el flujo $v_1$).

**Aplicación del análisis de flujos metabólicos en la selección y construcción de fenotipos de relevancia en Biotecnología**

Los enfoques clásicos para la obtención de fenotipos industriales han evolucionado constantemente hacia la utilización de estrategias más sistemáticas. Tradicionalmente, el fenotipo de los microorganismos utilizados en bioprocesos industriales fue consecuencia de un programa de desarrollo que típicamente incluye varios ciclos de mutagénesis al azar y selección, lo cual lógicamente trae aparejados cambios a nivel molecular y celular que no pueden ser predichos con exactitud (29). De hecho, en la mayoría de los casos se desconoce la naturaleza de las mutaciones introducidas. Con el advenimiento de las metodologías y técnicas de Ingeniería Metabólica, a través del conocimiento de la arquitectura genómica, las vías metabólicas pudieron ser convenientemente amplificadas, suprimidas, o moduladas basándose en la información derivada de la red metabólica del microorganismo (16, 35). A pesar de que se trata de un proceso sistemático, este tipo de enfoque normalmente está limitado a modificaciones 'locales' más que a la comprensión global del metabolismo microbiano. Si bien el nivel de expresión de ciertos genes y la concentración intracelular de proteínas y metabolitos proveen información importante acerca del comportamiento de la red metabólica en estudio, existen limitaciones inherentes a esta metodología para la descripción del fenotipo celular debido a la falta de información que integre estos parámetros y los correlacione para una comprensión holística del metabolismo. Además, en la mayoría de los

casos se ignora el bioproceso *in toto*, es decir, desde el diseño, construcción, y mejora de la cepa hasta el cultivo de la misma en un biorreactor.

Según se mencionó anteriormente, los flujos metabólicos pueden considerarse como una forma de representar el fenotipo de una célula como resultado de la interacción entre varios componentes celulares; los flujos observados reflejan las consecuencias conjuntas de los procesos de transcripción, traducción, y actividad enzimática, además de los (a menudo complejos) procesos regulatorios que los controlan. En otras palabras, se considera el sistema como un todo, y no sus partes constituyentes en forma individual. En forma aislada, cada flujo metabólico provee el grado de participación de la enzima o vía metabólica en estudio en funciones celulares y procesos metabólicos. De esta manera, en un ensayo de AFM se cuenta con información de los componentes individuales del metabolismo, pero dicha información puede ser integrada para la comprensión del **metaboloma** (ejemplo: el conjunto de flujos metabólicos del microorganismo en una condición determinada). Consecuentemente, la cuantificación de estos flujos *in vivo* es de especial importancia en el contexto de la fisiología celular para implementar estrategias efectivas de Ingeniería Metabólica (6), disciplina para la cual uno de los objetivos principales consiste en maximizar la conversión de un sustrato en un determinado producto (35). En la actualidad, el tiempo necesario para implementar un AFM completo disminuyó considerablemente gracias al desarrollo de metodologías de medición isotópica novedosas así como a la utilización de plataformas informáticas potentes.

Como ejemplo de aplicación, en la Fig. 4 se muestra un mapa de flujos metabólicos obtenido para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones anaeróbicas de cultivo. La información provista por este análisis sugiere que el principal destino de la glucosa utilizada como sustrato carbonado es la decarboxilación reductiva que transforma el piruvato en acetaldehído y posteriormente en etanol. El diseño de cepas etanologénicas de *S. cerevisiae* hizo uso extensivo de la información provista por este AFM, ya que permitió el re-direccionamiento racional de algunas vías competitivas a la síntesis de etanol (*viz.*, generación de precursores de biomasa) hacia la obtención del producto de interés, aumentando considerablemente el rendimiento de producto en sustrato (39).

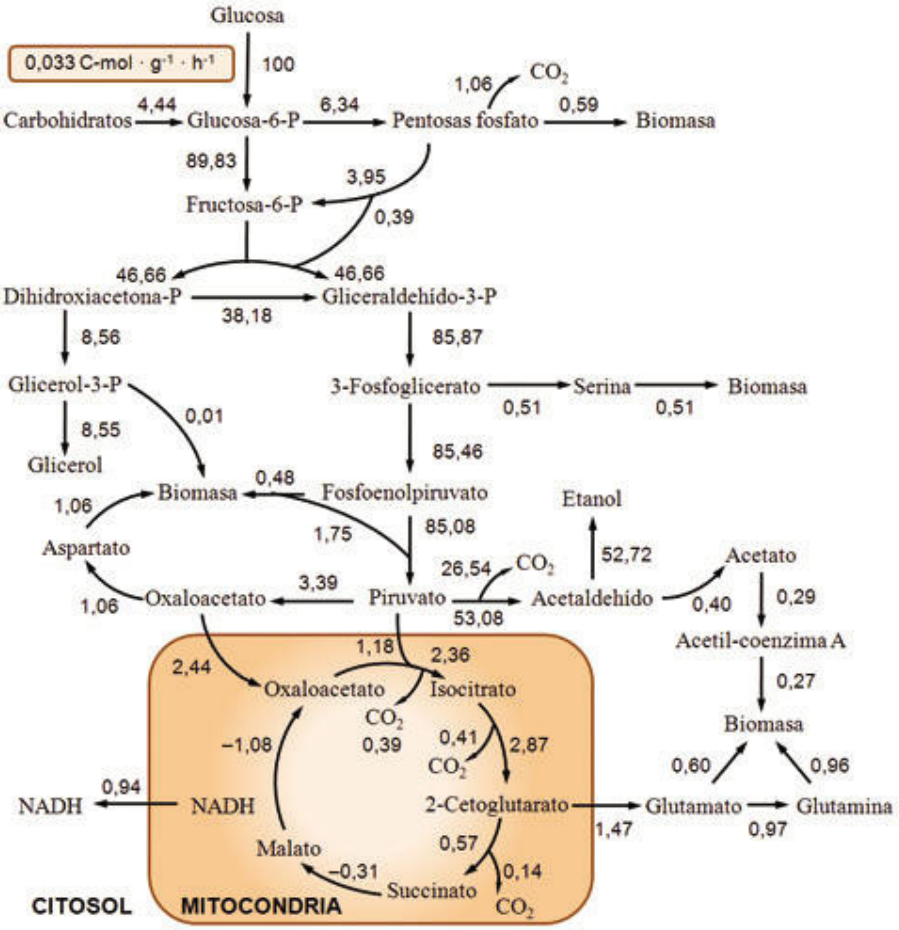


**Fig. 4.** Representación gráfica de los resultados de un ensayo de $^{13}$C-AFM realizado en cultivos anaeróbicos de *Saccharomyces cerevisiae*. El sustrato carbonado utilizado fue una mezcla de $^{13}C_U$-glucosa (uniformemente marcada), $^{13}C_1$-glucosa (marcada en la posición $C_1$), y glucosa no marcada. Para simplificar la visualización de los resultados, en muchos casos los flujos se representan como una fracción de la velocidad de consumo de sustrato (en este ejemplo, 0,033 C-mol de glucosa · g biomasa$^{-1}$ · h$^{-1}$). Para ello, se asigna arbitrariamente a este parámetro el valor de 100 y los flujos restantes toman valores porcentuales relativos respecto al consumo de sustrato. Obsérvese que el AFM permite explicitar la compartimentalización de las reacciones bioquímicas consideradas. Datos tomados de Nissen *et al*. (28).

En los últimos años se ha empleado el AFM como herramienta para el diseño y análisis de fenotipos industriales con frecuencia cada vez mayor y, de hecho, se ha sugerido que virtualmente cualquier metabolito en el metabolismo microbiano puede ser producido en forma eficiente si se manipulan los flujos metabólicos centrales en la forma adecuada. De acuerdo con este objetivo general, pueden distinguirse dos tipos de enfoque:

*a*) estudios en los cuales el AFM se utiliza para estudiar el metabolismo celular en condiciones compatibles con un bioproceso para el desarrollo de estrategias adecuadas para el crecimiento del microorganismo y producción de metabolitos de interés biotecnológico, y
*b*) utilización de AFM, llevados a cabo en condiciones estándar de cultivo, para identificar vías metabólicas cuya manipulación podría resultar ventajosa para la obtención de un fenotipo industrial.

Algunos de los ejemplos más relevantes disponibles en la lbibliografía se muestran en la Tabla 1. Estos ejemplos corresponden al primero de los dos tipos de enfoque recién discutidos. Al mismo tiempo, existen numerosos ejemplos dentro de la segunda categoría de ensayos para AFM, en particular en relación a la manipulación de reguladores globales de la expresión génica en *E. coli* como herramienta relevante en Biotecnología (27, 30, 47).

**Tabla 1.** Algunos ejemplos de la aplicación de AFM[a] para la evaluación de fenotipos microbianos asociados a bioprocesos de interés industrial.

| Producto | Microorganismo | Sustrato | Objetivo del estudio | Referencia |
|---|---|---|---|---|
| Lisina | *Corynebacterium glutamicum* | Glucosa | Seguimiento del bioproceso por mapeo de flujos meta-bólicos | (8) |
| Lisina | *Corynebacterium glutamicum* | Glucosa | AFM en mutantes fosfogluco-isomerasa | (23) |
| Lisina | *Corynebacterium glutamicum* | Glucosa | Mapeo en serie de flujos metabólicos en cultivos *fed-batch* | (9) |
| Lisina | *Corynebacterium glutamicum* | Glucosa fructosa | Estudio de la producción de lisina utilizando distintas fuentes de carbono | (18) |
| Glutamato | *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens* | | Comparación de flujos meta-bólicos en dos bacterias corineformes para la sínte-sis de glutamato | (33) |
| Fenilalanina | *Escherichia coli* | Glucosa | AFM en serie utilizando un sistema sensor-reactor | (40) |
| Metionina | *Corynebacterium glutamicum* | Glucosa treonina | Investigación del efecto de la eliminación de McbR en el metabolismo de *C. gluta-micum* | (22) |
| Succinato | *Actinobacillus succinogenes* | Glucosa | AFM de la producción de succinato utilizando RMN y CG-EM | (24) |
| Etanol | *Saccharomyces cerevisiae* | Glucosa | Estudio del cambio metabó-lico durante la transición de condiciones de crecimiento aeróbicas a anaeróbicas | (12) |
| Etanol | *Saccharomyces cerevisiae* | Glucosa xilosa | Comparación del metabo-lismo de cepas recombi-nantes en condiciones fermentativas utilizando dos fuentes de carbono de interés industrial | (13) |
| Penicilina G | *Penicillium chrysogenum* | Glucosa gluconato | Investigación del metabo-lismo citosólico de NADPH en cultivos continuos en condiciones de crecimiento y producción de penicilina G | (20) |
| Lisina | *Corynebacterium glutamicum* | Glucosa | Estimación de flujos meta-bólicos *in vivo* a partir de mediciones respirométricas | (45) |
| Lisina | *Corynebacterium glutamicum* | Glucosa sacarosa fructosa | Investigación del efecto de la sobre-expresión y modula-ción de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa | (2) |
| Lisina | *Escherichia coli* | Glucosa | Análisis de la producción de lisina a partir de mediciones de aminoácidos utilizando CL acoplada a EM | (14) |
| Riboflavina | *Bacillus subtilis* | Glucosa | Análisis del cambio en flujos metabólicos en dos condi-ciones de producción de riboflavina | (46) |
| Carotenoides | *Phaffia rhodozyma* | Glucosa | Interpretación del metabolis-mo en condiciones de producción de pigmentos | (4) |
| 1,3-Propanodiol | *Escherichia coli* | Glucosa | AFM en condiciones no-estacionarias | (1) |
| Acetato de etilo | *Pichia anomala* | Glucosa | Estudio de la regulación metabólica dependiente de oxígeno y fuente de carbono | (11) |
| Glicerol | *Saccharomyces cerevisiae* | Glucosa | AFM de una cepa sobre-productora utilizando CG-EM, CL-EM, y RMN | (19) |
| Penicilina G | *Penicillium chrysogenum* | Gluconato glucosa | Descripción de un método basado en marcación con $^{13}$C-gluconato para la determinación del flujo a través de la vía de pentosas fosfato | (21) |

[a] Las abreviaturas utilizadas son: AFM, análisis de flujos metabólicos; CL, cromatografía líquida; EM, espectrometría de masas; RMN, resonancia magnética nuclear.

**Conclusión y perspectivas**

En un futuro, probablemente cercano, la integración de las tecnologías disponibles para el análisis del comportamiento metabólico, incluyendo $^{13}$C-AFM, permitirá la comprensión de la dinámica celular *in vivo* y conducirán al desarrollo eficaz y racional de bioprocesos industriales. En la actualidad estas metodologías están comenzando a ser utilizadas durante el desarrollo de procesos biotecnológicos con frecuencia cada vez mayor, pero aún así se recurre usualmente a las técnicas clásicas de mejora y selección para la mayoría de los protocolos de obtención de fenotipos industriales. Un desarrollo prometedor, ligado al advenimiento de metodologías de detección de metabolitos de alta sensibilidad y herramientas informáticas poderosas, es el AFM en tiempo real; esto es, durante el bioproceso. La elucidación de la distribución de flujos metabólicos *in situ* permitiría tomar acciones correctivas del bioproceso e indudablemente conduciría a una notable mejora del mismo. Por ejemplo, Soga (34) ha descripto la utilización de electroforesis capilar acoplada a EM para la detección simultánea y en tiempo real de más de 1000 metabolitos cargados. Otros aspectos en los cuales la introducción de mejoras en el análisis del metaboloma permitiría una mejor comprensión y/o el desarrollo efectivo de bioprocesos son:

*a*) AFM en células eucariotas (libres y en tejidos). Debido a la compartimentalización inherente a este tipo de células, el análisis de isotopómeros e integración matemática de los resultados se vuelven considerablemente más complejos. Por ejemplo, el oxaloacetato es un metabolito que se encuentra simultáneamente en la matriz mitocondrial y en el citosol en concentraciones distintas, y el patrón de marcación isotópica como única herramienta de estudio no permite discernir la localización sub-celular de este metabolito. Asimismo, en un cultivo de células de mamífero, las velocidades de crecimiento son tan bajas que la cuantificación de flujos metabólicos posee asociada importantes errores.

*b*) estudios poblacionales mediante AFM. Es un hecho conocido y ampliamente descripto que aún en un cultivo continuo que ha alcanzado condiciones de equilibrio dinámico existe más de una población metabólicamente identificable. En la mayoría de los casos, la existencia de sub-poblaciones no altera significativamente los resultados del análisis, pero si el equilibrio poblacional se relaciona con un fenotipo de interés industrial (*e.g.*, pérdida de la capacidad de sintetizar un metabolito, o enriquecimiento del cultivo en células con mutaciones adaptativas, etc.) sería particularmente necesario distinguir entre las poblaciones presentes en el cultivo. Esta distinción requiere del desarrollo de técnicas que permitan el estudio de flujos metabólicos a nivel de células aisladas.

*c*) medición de metabolitos intracelulares y estimación de flujos independiente del análisis retrobiosintético, en el cual se basa la metodología de AFM. Como se mencionó anteriormente, los flujos metabólicos en un ensayo de $^{13}$C-AFM se deducen a partir de la presencia y abundancia de metabolitos marcados utilizando metodologías basadas en simulaciones *in*

*silico*. Esto, por definición, implica la existencia de errores asociados al método de análisis, cuya magnitud podría ser reducida si la concentración intracelular de al menos algunos metabolitos en la red bioquímica pudiese ser directamente determinada *in vivo* sin alterar el metabolismo celular.

Por lo tanto, puede concluirse que la implementación de $^{13}$C-AFM como herramienta de análisis y control de bioprocesos se encuentra actualmente en un estadío temprano de desarrollo y es altamente plausible de ser mejorada y adaptada a los requerimientos de cada proceso en particular.

**Agradecimientos**

Agradezco muy especialmente a mis directores, Dr. Miguel A. Galvagno y Dra. Beatriz S. Méndez, por su constante apoyo y estimulación. Asimismo, agradezco al Dr. George N. Bennett, Dr. Jiangfeng Zhu, y Dr. Ka-Yiu San (Departamento de Bioquímica y Biología Celular, y Departamento de Bioingeniería; Rice University, Houston, Texas) por haberme ofrecido la posibilidad de trabajar en un laboratorio líder en el análisis de flujos metabólicos; y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina) y la *American Society for Microbiology* (EE.UU.) por el apoyo económico brindado durante mi estadía en Rice University.

**Referencias bibliográficas**

1. Antoniewicz MR, Kraynie DF, Laffend LA, Gonzalez-Lergier J, Kelleher JK, Stephanopoulos G, 2007. Metabolic flux analysis in a non-stationary system: fed-batch fermentation of a high yielding strain of *E. coli* producing 1,3-propanediol. *Metab. Eng.* 9: 277-292.

2. Becker J, Klopprogge C, Herold A, Zelder O, Bolten CJ, Wittmann C, 2007. Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* – Over expression and modification of G6P dehydrogenase. *J. Biotechnol.* 132: 99-109.

3. Blum JJ, Stein RB. On the analysis of metabolic networks. *Biological regulation and development*, Goldberger RF (ed.), Plenum Press, New York, 1982, 99-124.

4. Cannizzaro C, Christensen B, Nielsen J, von Stockar U, 2004. Metabolic network analysis on *Phaffia rhodozyma* yeast using $^{13}$C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry. *Metab. Eng.* 6: 340-351.

5. Christensen B, Nielsen J, 1999. Isotopomer analysis using GC-MS. *Metab. Eng.* 1: 282-290.

6. Christensen B, Nielsen J, 1999. Metabolic network analysis, a powerful tool in metabolic engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 66: 209-231.

7. Dauner M, Sauer U, 2001. GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol. Prog.* 76: 642-649.

8. Drysch A, El Massaoudi M, Mack C, Takors R, de Graaf AA, Sahm H, 2003. Production process monitoring by serial mapping of microbial carbon flux distributions using a novel sensor reactor approach: II. $^{13}$C-labeling-based metabolic flux analysis and L-lysine production. *Metab. Eng.* 5: 96-107.

9. Drysch A, El Massaoudi M, Wiechert W, de Graaf AA, Takors R, 2004. Serial flux mapping of *Corynebacterium glutamicum* during fed-batch L-lysine production using the sensor reactor approach. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 497-505.

10. Fischer E, Sauer U, 2003. Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur. J. Biochem.* 270: 880-891.

11. Fredlund E, Blank LM, Schnurer J, Sauer U, Passoth V, 2004. Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5905-5911.

12. Frick O, Wittmann C, 2005. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative $^{13}$C flux analysis. *Microb. Cell Fact.* 4: 30.

13. Grotkjaer T, Christakopoulos P, Nielsen J, Olsson L, 2005. Comparative metabolic network analysis of two xylose fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab. Eng.* 7: 437-444.

14. Iwatani S, van Dien S, Shimbo K, Kubota K, Kageyama N, Iwahata D, Miyano H, Hirayama K, Usuda Y, Shimizu K, Matsui K, 2007. Determination of metabolic flux changes during fed-batch cultivation from measurements of intracellular amino acids by LC-MS/MS. *J. Biotechnol.* 128: 93-111.

15. Jetten MSM, Sinskey AJ, 1995. Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15: 73.

16. Kacser H, Acerenza L, 1993. A universal method for achieving increases in metabolite production. *Eur. J. Biochem.* 216: 361-367.

17. Kelleher JK, 2001. Flux estimation using isotopic tracers: common ground for metabolic physiology and metabolic engineering. *Metab. Eng.* 3: 100-110.

18. Kiefer P, Heinzle E, Zelder O, Wittmann C, 2004. Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 229-239.

19. Kleijn RJ, Geertman JM, Nfor BK, Ras C, Schipper D, Pronk JT, Heijnen JJ, van Maris AJ, van Winden WA, 2007. Metabolic flux analysis of a glycerol-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strain based on GC-MS, LC-MS and NMR-derived $^{13}$C-labelling data. *FEMS Yeast Res.* 7: 216-231.

20. Kleijn RJ, Liu F, van Winden WA, van Gulik WM, Ras C, Heijnen JJ, 2007. Cytosolic NADPH metabolism in penicillin-G producing and non-producing chemostat cultures of *Penicillum chrysogenum*. *Metab. Eng.* 9: 112-123.

21. Kleijn RJ, van Winden WA, Ras C, van Gulik WM, Schipper D, Heijnen JJ, 2006. $^{13}$C-labeled gluconate tracing as a direct and accurate method for determining the pentose phosphate pathway split ratio in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4743-4754.

22. Kromer JO, Heinzle E, Schroder H, Wittmann C, 2006. Accumulation of homolanthionine and activation of a novel pathway for isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* McbR deletion strains. *J. Bacteriol.* 188: 609-618.

23. Marx A, Hans S, Mockel B, Bathe B, de Graaf AA, McCormack AC, Stapleton C, Burke K, O'Donohue M, Dunican LK, 2003. Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104: 185-197.

24. McKinlay JB, Shachar-Hill Y, Zeikus JG, Vieille C, 2007. Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of $^{13}$C-labeled metabolic product isotopomers. *Metab. Eng.* 9: 177-192.

25. Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaechter M, *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Sunderland, MA, Sinauer Associates, 1990.

26. Neijssel OM, Teixeira de Mattos MJ, 1994. The energetics of bacterial growth: a reassessment. *Mol. Microbiol.* 13: 179-182.

27. Nikel PI, Zhu J, San KY, Méndez BS, Bennett GN, 2009. Metabolic flux analysis of Escherichia coli creB and arcA mutants reveals shared control of carbon catabolism under microaerobic growth conditions. J. Bacteriol. 191: 5538-5548

28. Nissen TL, Schulze U, Nielsen J, Villadsen J, 1997. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143: 203-218.

29. Park JH, Lee SY, Kim TY, Kim HU, 2008. Application of systems biology for bioprocess development. *Trends Biotechnol.* 26: 404-412.

30. Perrenoud A, Sauer U, 2005. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187: 3171-3179.

31. Sauer U, Hatzimanikatis V, Bailey JE, Hochuli M, Szyperski T, Wüthrich K, 1997. Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nat. Biotechnol.* 15: 448-452.

32. Schmidt K, Carlsen M, Nielsen J, Villadsen J, 1997. Modelling isotopomer distribution in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnol. Bioeng.* 55: 831-840.

33. Shirai T, Nakato A, Izutani N, Nagahisa K, Shioya S, Kimura E, Kawarabayasi Y, Yamagishi A, Gojobori T, Shimizu H, 2005. Comparative study of flux redistribution of metabolic pathway in glutamate production by two coryneform bacteria. *Metab. Eng.* 7: 59-69.

34. Soga T, 2007. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for metabolomics. *Methods Mol. Biol.* 358: 129-137.

35. Stephanopoulos G, Aristidou AA, Nielsen J, *Metabolic engineering: principles and methodologies*. San Diego, CA, Academic Press, 1998.

36. Vallino JJ, Stephanopoulos G, 1993. Metabolic flux distribution in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 633-646.

37. van Winden W, Verheijen P, Heijnen S, 2001. Possible pitfalls of flux calculations based on $^{13}$C-labeling. *Metab. Eng.* 3: 151-162.

38. Varma A, Palsson BO, 1994. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Bio/Technology* 12: 994-998.

39. Vertès AA, Inui M, Yukawa H, 2008. Technological options for biological fuel ethanol. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15: 16-30.

40. Wahl A, El Massaoudi M, Schipper D, Wiechert W, Takors R, 2004. Serial $^{13}$C-based flux analysis of an L-phenylalanine-producing *E. coli* strain using the sensor reactor. *Biotechnol. Prog.* 20: 706-714.

41. Wiechert W, 2001. $^{13}$C Metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* 3: 195-206.

42. Wiechert W, Möllney M, Isermann N, Wurzel M, de Graaf AA, 1999. Bidirectional reaction steps in metabolic networks. Part III: Explicit solution and analysis of isotopomer labeling systems. *Biotechnol. Bioeng.* 66: 69-85.

43. Wiechert W, Möllney M, Petersen S, de Graaf AA, 2001. A universal framework for $^{13}$C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* 3: 265-283.

44. Wittmann C, Heinzle E, 1999. Mass spectrometry for metabolic flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 739-750.

45. Yang TH, Wittmann C, Heinzle E, 2006. Respirometric $^{13}$C flux analysis. Part II: *In vivo* flux estimation of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 8: 432-446.

46. Zamboni N, Fischer E, Muffler A, Wyss M, Hohmann HP, Sauer U, 2005. Transient expression and flux changes during a shift from high to low riboflavin production in continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 89: 219-232.

47. Zhu J, Shalel-Levanon S, Bennett GN, San KY, 2006. Effect of the global redox sensing/regulation networks on *Escherichia coli* and metabolic flux distribution based on C-13 labeling experiments. *Metab. Eng.* 8: 619-627.

QuímicaViva
ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

*Revista **QuímicaViva***
*Número 2, año 8, Agosto de 2009*
*quimicaviva@qb.fcen.uba.ar*