

Entrevista al Dr. Eduardo Charreau Presidente del CONICET, realizada el 7 de julio de 2003

El Dr. Eduardo Hernán Charreau, actual presidente del CONICET, función que ejerce desde hace un año, es Profesor Titular del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales e Investigador Superior del CONICET. Químico de origen, es a sus 63 años, un destacado Endocrinólogo Molecular, Director del Instituto de Biología y Medicina Experimental. En esta brevísima semblanza queremos destacar su excelencia para dictar clases en los temas básicos de Química Biológica, sin embargo, a lo largo de la entrevista que nos brindó como integrantes del Comité Editorial de **Química Viva**, conversamos con él principalmente acerca del futuro del CONICET.

QV ¿Qué modificaciones se han realizado al Estatuto del CONICET desde su fundación en 1958? ¿Cómo influyen estas modificaciones, si es que las hubo, en las funciones de ejecución y promoción del organismo? En particular, qué cambios han ocurrido en los últimos años en los criterios que rigen el Ingreso de personal? ¿Son compatibles con la estructura actual del Estado?

Dr E. Charreau: El estatuto de la Carrera fue aprobado por Decreto- Ley N° 20464 del 23 de mayo de 1973. Anteriormente existía un reglamento dictado por el propio Directorio del CONICET, de acuerdo con las facultades asignadas en el artículo 2.º del Decreto Ley 1291/58 (ley fundacional del CONICET). Ese decreto establecía las pautas y criterios para ingresar y ser reconocido como miembro de la Carrera del Investigador. La Carrera se instrumentó en el año 1960 sobre la base de contratos sujetos a evaluaciones y renovaciones periódicas. En 1973, se establecieron las condiciones que hoy regulan la Carrera, adquiriendo sus miembros el régimen de estabilidad del empleado público y sujeto a dos tipos de normativas: las específicas en su calidad de miembros de la carrera y las de alcance general que rigen para todos los empleados de la administración pública. La permanencia en la Carrera está sujeta a un rendimiento medido en términos de la calificación de los informes (con dos informes no aceptables en un sexenio, el investigador podría perder su condición de tal).

En cuanto al ingreso se han aumentado las exigencias. En los últimos años aún cuando no lo establezca taxativamente el Estatuto, se requiere contar con una formación de post-gradó y un entrenamiento post-doctoral.

El Estatuto conforma un régimen con escalafón especial para el sector científico-técnico, puesto que la administración pública nacional se rige por otro sistema conocido como SINAPA.

QV-A principios de los 90 con la reforma del estado se congelaron los ingresos a la administración pública ¿cómo elude esta situación el CONICET?

Dr. E. Charreau El CONICET salva esta situación pidiendo el descongelamiento de las vacantes y/o la apertura de nuevos cargos. Este tipo de pedidos se realiza año a año. El CONICET conoce las vacantes que se producen dentro de su estructura por el recambio debido a jubilaciones, fallecimientos u otras causas. El cálculo final de las vacantes depende del presupuesto que le va a quedar y de las necesidades. Luego se hacen dos pedidos que van por decisiones administrativas distintas. Por un lado, un tratamiento

de aprobación del Poder Ejecutivo Nacional al que se suma la situación más restrictiva del decreto 491, según el cual los nombramientos tienen que ser además firmados por el presidente de la Nación, lo cual complica un poco más la situación. En las Universidades, así como en el Servicio Penitenciario, eso no ocurre y las autoridades pueden hacer las designaciones sin dicho requisito. Por eso estamos pidiendo ser eximidos de ese decreto ya que se alargan los trámites, porque es otro tiempo que se agrega a la escalera de Ciencia y Técnica, Ministerio de Educación, Presidencia. El problema de los cargos es que el CONICET no tuvo políticas de ingresos. Los ingresos han tenido altas y bajas, hubo, por ejemplo, tres años sin ingresos. Que haya habido situaciones particulares de índole política por las cuales no se han querido tomar ingresos no lo puedo decir, no he vivido esa parte de la gestión. Sí conozco las administrativas, no había presupuesto para más vacantes. Concretamente, si administrativamente no hay dinero o vacantes, no hay ingresos. Una opción sería llamar a concurso de todos modos, y luego presionar con la lista de gente. Recientemente han pasado años sin ingresos, y se han acumulado muchos postulantes para pocas vacantes. El CONICET trata de mantener los números en 1000 becas y 500 ingresos a la Carrera por año.

Se intenta llegar a la situación de que todas las personas que tengan méritos suficientes puedan ingresar.

QV- ¿No cree Ud. que hay muchas exigencias para ingresar al CONICET pero una vez adentro pareciera no haber penalización para el que no cumple?

Dr.E.Charreau No creo que sea así. Hay un porcentaje importante de investigadores que quedan fuera del sistema porque sus presentaciones no están de acuerdo con el estatuto del CONICET. El CONICET tiene una serie de mecanismos de reaseguros, pares, comisiones de asesores, la Junta y el Directorio. Para los investigadores que reclaman se forman comisiones especiales. En algunos casos se revoca la decisión anterior pero esto no es una constante. El proceso no es inmediato, cuando se produce la negativa a un informe puede llevar de 2 ó 3 años hasta que la persona quede fuera del sistema.

QV. ¿Considera Ud. que sería de utilidad para evaluar a los candidatos a ingresar a la Carrera del Investigador efectuar una entrevista personal que sirva para orientar sobre su capacidad de desempeñarse autónomamente, además de utilizar la planilla de evaluación?

Dr.E.Charreau Los evaluadores del CONICET saben distinguir entre trabajos multidisciplinarios y aquellos en los cuales los autores están de relleno curricular. Los evaluadores del CONICET se distinguen bien del resto, tienen una cultura de evaluación. Además, hay otros puntos que se considera que son fundamentales como la producción por área y categoría. La institución está informatizada, existen parámetros disponibles que no existían en otras épocas. Los valores medios de una disciplina son fundamentales para una evaluación más justa, no se puede exigir por promoción situaciones en las cuales la especialidad está lejos de ese punto. Es decir, si una determinada especialidad para una determinada categoría está en una publicación por año, no se pueden exigir tres trabajos para la promoción. El trabajo de las comisiones está normatizado, se sabe la calidad y producción esperable de cada disciplina.

QV- ¿Conoce usted si existe algún proyecto nuevo de parte de las actuales autoridades de Ciencia y Técnica que involucre al CONICET?

Dr.E.Charreau: Cualquiera de los programas de Ciencia y Técnica van siempre a involucrar al CONICET. El CONICET está manteniendo una estructura que en la parte de investigación científica tiene el mayor número de participantes activos del país, hay algunos cálculos que dicen que el valor promedio de publicaciones de un investigador del país es del orden de 0,3-0,4 publicaciones por año, cuando se transforma en un investigador del CONICET supera una publicación por año. Lo cual está indicando que de alguna forma el CONICET apoya al investigador.

Cualquiera de los programas de Ciencia y Técnica siempre tocan al CONICET y particularmente el "Plan Nacional de Ciencia Técnica" que se presentó la semana pasada. Cuando se estudia el contenido de dicho plan se ve que las estrategias involucran al CONICET, desde el programa de recomposición etaria de los recursos humanos, sobre los cuales está dando normativas el CONICET, programas de mejoramiento

salarial, programas de perfeccionamiento de recursos humanos dedicado a los investigadores. Están tocando las 9.000 almas que están en el CONICET. Cuando se revisa el Plan, el CONICET es parte importante del mismo.

No hay nada nuevo, no hay nubarrones, por el contrario, la capacidad de crecimiento del CONICET es auspiciosa, tanto en número como en proyectos de recomposición salarial y de investigación.

El Plan Nacional de Ciencia Técnica presentado es una propuesta para el debate, si no existiera no entraría en el presupuesto nacional, debe acompañar al presupuesto. La Secretaria de Ciencia y Técnica lo presenta en diversos ambientes para recibir la retroalimentación correspondiente, en teoría todos los relacionados con Ciencia y Técnica pueden opinar. El Secretario de Ciencia y Técnica estuvo en el CONICET y escuchó al CONICET, quien le presentó su plan de crecimiento. Este plan es la base para iniciar una programación de 5 años.

QV- ¿El Directorio del CONICET es el mismo?

Dr. E.Charreau. No, hay cambios por elecciones de un miembro por las Ciencias Exactas, un miembro por Ingeniería, un miembro por las provincias proveniente de COFECYT y un miembro de las entidades empresarias.

QV-: Las fuentes principales de financiamiento de proyectos en los últimos años se han concentrado en entes como la Agencia de Promoción, o directamente en recursos provenientes de convenios internacionales que, en general, otorgan sumas importantes a grupos grandes, de larga trayectoria. En este aspecto, la participación del CONICET se ha reducido significativamente, ya que, mientras se ha regularizado el otorgamiento de becas y promociones durante su gestión, no ha ocurrido lo mismo con las convocatorias a subsidios de proyectos. ¿El CONICET dispone o dispondrá de fondos genuinos para retomar esta función? ¿Cuál es su opinión acerca de la posibilidad de implementar un subsidio básico en apoyo de proyectos para todos los investigadores que se hayan desempeñado satisfactoriamente en los últimos años, similar a los subsidios UBACyT ?

Dr E.Charreau. El CONICET espera recuperar la capacidad de poder financiar nuevamente al sistema. La política de distribución de subsidios ha variado respecto a la que tenía el CONICET. No digo que sea mejor o peor, tener la Agencia es tener otra ventanilla, es importante. Dentro de nuestras posibilidades creemos que este año terminaremos de financiar todos los compromisos que tomamos antiguamente, ya fuimos pagando subsidios del 96/98 y se empezó a pagar el 2000, se terminará de pagar los subsidios de re-equipamiento llamados un año atrás.

Ahora estaría a consideración revisar quizás un poco la política de subsidios. Particularmente yo creo que por el sólo hecho de tener informes aprobados y/o el ingreso a Carrera, el investigador tendría que tener un subsidio base, no de un monto importante, porque el presupuesto no va a dar. Mi idea, que el Directorio también la discutió, es otorgar un subsidio basado en la actividad y trayectoria del investigador. Ello no quita que el investigador se pueda presentar a subsidios más competitivos y no descarto que el CONICET pueda dar subsidios competitivos además de estos.

Hay investigadores que sostienen que esto no sirve, que sólo sirven los subsidios de montos mayores. Yo pienso que es importante aspirar a subsidios de 30.000-40.000 dólares anuales pero la realidad es que en el país puede haber alrededor de 1000 grupos competitivos que merecen ser financiados y el presupuesto no alcanza. Por eso hay que encontrar otro tipo de financiamiento como el subsidio base, si existen suficientes fondos todos los grupos buenos los van a sacar.

QV: ¿Está prevista la participación del CONICET en los proyectos conjuntos de investigación y desarrollo con los países del MERCOSUR? ¿De qué manera? ¿Qué beneficios se esperan de este intercambio?

Dr. E.Charreau: El CONICET tiene actividades con el Mercosur preferenciales. Con Brasil ha habido un acercamiento especial pues vino en ayuda de Argentina ofreciendo una serie de posibilidades. Una de ellas fue la red electrónica de publicaciones. Además CONICET tiene programas de intercambio con distintos países, no son de gran magnitud pero los piensa acrecentar.

QV: ¿Cree Ud. que para favorecer el desarrollo de la investigación en otras áreas del país se podría fomentar el traslado de investigadores?

Dr E.Charreau: Es un tema complejo ya que la gente no quiere irse de Buenos Aires. El nuevo plan de Ciencia y Técnica pone dentro de las posibilidades proyectos de residencia en áreas de vacancia temática y básica, facilitando para determinados grupos 500.000 a 600.000 pesos por año, por un determinado tiempo.

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Vol. 2, número 2, 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Volumen 2, Número 2, septiembre de 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

El camino circular de la vacunación antivariólica

por Celia E.Coto

Viróloga.

Profesora titular consulta de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Investigadora superior del CONICET.

Recibido 10 de julio de 2003/ Aceptado 20 de julio de 2003

Hay caminos de todo tipo y formas, pero los más celebrados son los caminos rectos, con un principio y un fin. Un origen y una meta. Dicho en otros términos, un camino que se inicia con un objetivo y termina con su concreción. Así fue el derrotero de la erradicación de la temible y deformante viruela, causada por el virus del mismo nombre, perteneciente a la familia *Poxviridae* (1). La lucha contra la enfermedad se inició el 14 de mayo de 1796 cuando Jenner demostró que la inoculación con un virus relacionado antigénicamente brindaba protección y terminó en 1980 cuando la Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció la erradicación de la enfermedad en el mundo, habiéndose registrado el último caso de viruela natural en Somalia, África, en 1977. Quizá interese saber, que el costo estimado de la campaña de erradicación de la enfermedad, fue de 300 millones de dólares.

Las consecuencias de esta nueva situación sanitaria, fue la recomendación de abandonar la vacunación antivariólica debido a los riesgos que representaba su administración a las personas inmunosuprimidas, cuyo número fue aumentando precisamente a partir de 1980 con la irrupción del SIDA en la población humana.

La paradoja del presente es que el virus de viruela se extinguió en la naturaleza, pero el temor que éste sea utilizado como arma biológica, determinó el regreso a la práctica generalizada de la vacunación antivariólica y un retroceso a la situación imperante hace veinte años, recorriendo un camino circular.

Repercusiones y consecuencias de la erradicación

Con mucho entusiasmo, los científicos celebraron la victoria, el virus de viruela había sido derrotado como especie predatora del hombre, y aunque se encontraba muy bien guardado en las congeladoras de los institutos de investigación, al no existir otros reservorios animales; su

extinción en la naturaleza parecía inevitable.

Así, en la tercera edición del libro *Vaccines* de Stanley A. Plotkin y Walter A Orenstein, W.B. Saunders Company 1999, se puede leer en el capítulo **6: Viruela y Vaccinia**: “La viruela es al presente una enfermedad de interés histórico solamente; su erradicación ha sido certificada por la Asamblea de la Organización Mundial de la Salud el 8 de mayo de 1980”. Sus autores, Donald Henderson y Bernard Moss, reconocidos virólogos, no imaginaron que poco tiempo después el virus de la viruela se convertiría en uno de los agentes más temidos por millones de habitantes en los Estados Unidos.

Algunas características de los virus Pox

Los virus Pox (pústula) son una nutrida familia de virus ADN causantes de enfermedades en vertebrados e insectos. Son virus de gran tamaño cuyas partículas de forma de ladrillo están constituidas en un 90% por proteínas, entre las cuales se encuentran todas las enzimas necesarias para su replicación. A pesar de ello, no han podido alcanzar un estado de independencia total respecto de una célula huésped, y en consecuencia, su parasitismo los mantiene dentro del grupo de los virus. Dentro de esta familia, los virus que infectan a vertebrados, como los virus viruela, vaccinia (virus de la vacuna), cow pox, monkey pox y canary pox, se agrupan en el género Orthopox. Como los miembros de un mismo género comparten un antígeno en común, la nucleoproteína, la inoculación con el virus de vacuna protege contra el virus de viruela. Existen dos variantes del virus de viruela que se distinguen por su virulencia para el hombre, la viruela o variola mayor (30 a 50% de mortalidad) y la variola menor o Allastrim (1% de mortalidad). Aunque también la viruela de los monos puede ser transmitida al hombre, así como la viruela de las vacas, la viruela del río Tana y el nódulo del tambero.

El virus de viruela está clasificado en la categoría A entre los agentes que pueden ser usados como armas biológicas, su peligrosidad se basa en su capacidad para infectar por vía aerógena. La transmisión se realiza de persona a persona, a través de la inhalación de pequeñas gotas conteniendo virus que son liberadas al ambiente, las costras secas que recubren las pústulas no son tan infecciosas pero presentan una extremada resistencia a la desecación y al calor. Como consecuencia de su erradicación existe un buen número de personas susceptibles que podrían ser el núcleo de iniciación de una epidemia ante la liberación intencional de virus al medio ambiente.

La vidriera del mundo

Necesariamente tenemos que concentrarnos en el pasado y en el presente del virus de viruela en los Estados Unidos para recorrer el camino circular de la vacunación antivariólica.

La vacunación contra la viruela comenzó en aquel país en 1800 promovida por la acción de Thomas Jefferson. Se utilizaba la vacuna original de Jenner y la práctica de vacunar consistía en pasar material infeccioso de brazo en brazo. Esta modalidad traía como consecuencia la aparición de casos típicos de la enfermedad. Hacia 1897 esta técnica de vacunación fue reemplazada por el uso del virus vaccinia preparado sobre la panza de terneras, y en 1927 la viruela parecía haber sido erradicada. Sin embargo, en su lugar, se había instalado en la población la variedad atenuada (Allastrim) que pasó a ser la forma predominante, con una mortalidad variable entre el 0,3 al 1%. Las autoridades habían logrado que la Corte Suprema de Justicia declarara obligatoria la vacunación, pero debido a la existencia de grupos que no aceptaban dicha práctica por motivos religiosos, y de rebeldes a quienes no les gustaba acatar imposiciones, la presencia de la variola menor se extendió hasta 1949, año en que se registró el último caso. La práctica de la vacunación continuó, no obstante, hasta 1971.

El proyecto global de erradicación

Rusia había presentado a las Naciones Unidas en 1958, un proyecto global de erradicación de la viruela que fue apoyado por el resto de los miembros integrantes de la Organización, aunque recién en 1966, la OMS recibe los fondos para llevarlo a cabo. Cuando el éxito coronó el proyecto no se dieron por terminadas las acciones e inmediatamente se formó un Comité de Orthopoxvirus presidido por el notable virólogo Frank Fenner para resolver los pasos a seguir en la era posterior a la erradicación. Se realizaron numerosas recomendaciones para continuar con algunas investigaciones referentes al virus, entre ellas, la más urticante fue la recomendación de destruir los stocks de virus en 1999. Fecha que se postergó por resolución de la OMS hasta 2002 en reconocimiento a la necesidad de avanzar en las investigaciones propuestas. Es más verosímil creer que la destrucción efectiva se fue posponiendo por otras razones, ya que el fantasma de la utilización de armas biológicas para acciones terroristas flotaba en las mentes de muchos funcionarios civiles y militares. Sólo fueron autorizados dos lugares en el mundo para conservar los stocks de viruela: los laboratorios del CDC (Centers for Disease Control) de Atlanta, en EE. UU. y el "Centro de Virología y Biotecnología" del Instituto de Investigación Estatal en Novosibirsk, Rusia.

Balanza desnivelada: adquirimos más conocimientos científicos y creemos menos en el accionar del hombre

James W. LeDuc y Peter B. Jahrling (2) resumen en un trabajo publicado un año antes que venciera el plazo de la destrucción de los stocks, los hallazgos obtenidos como resultado de las recomendaciones. Las investigaciones se realizaron en colaboración entre los científicos del departamento de defensa, el CDC y el NIH (National Institute of Health) en coordinación con investigadores rusos.

Se seleccionaron y estudiaron 49 aislamientos de Variola mayor y menor, que fueron manipulados en condiciones de máxima bioseguridad (nivel 4). Estos aislamientos abarcaban un período de cuarenta años y provenían de diferentes lugares geográficos de modo de estudiar una colección de máxima diversidad. El estudio comprendió los siguientes objetivos: a) desarrollo de

serología moderna. b) análisis genómico de fragmentos de restricción seguido de secuenciación en algunos casos. c) búsqueda de una droga efectiva antiviral y d) establecimiento de un modelo animal que permitiera estudiar la patogénesis de la enfermedad y aplicar las drogas antivirales.

Como resultado de dichos estudios se conoció el genoma completo del virus de viruela y se caracterizaron los genes responsables de la virulencia. Después de ensayar aproximadamente 74 compuestos se encontró que el cidofovir era el más eficaz, y a partir del mismo se pudo preparar un medicamento oral. Por otra parte, la enfermedad pudo reproducirse en los monos cinomolgos, se pudo establecer la filogenia del virus y conocer la secuencia completa de la cepa de viruela de Somalia.

Preocupación por la viruela de los monos

Mientras ocurrían estos acontecimientos con el virus de viruela, se despertaron algunos temores ante la falta de vacunación (recordemos que los virus pox pueden proteger en forma cruzada) a raíz de estudios cuidadosos realizados en el Zaire en el período 1981-1986 de casos naturales de viruela de los monos. La viruela de los monos (Monkey pox) es una enfermedad zoonótica producida por un orthopox relacionado que incidentalmente puede pasar al humano. Clínicamente, la enfermedad en el hombre es parecida a la viruela con la misma mortalidad pero con poca capacidad para propagarse. La enfermedad es común en ciertas regiones del África y puede encontrarse asociada a otros animales como las ardillas, siendo susceptibles también las ratas, ratones y conejos (4).

Sorprendentemente, en Junio de 2003, se reportaron varios casos de viruela de los monos en los Estados Unidos. Las personas infectadas se enfermaron por contacto con roedores mascotas, llamados perritos de la pradera, enfermos con "Monkey pox". A los doce días después de la infección las personas desarrollaron fiebre, dolores musculares, agrandamiento de los nódulos linfáticos, cansancio. Después sufrieron un "rash" y por último, tuvieron ampollas en la cara, manos y el resto del cuerpo que luego de pasar por distintos estadios terminaron en costras, que al caerse, dejaron cicatrices. La enfermedad duró entre 2 a 4 semanas. Mientras en África la mortalidad es significativa, en los Estados Unidos, debido al mejor estado nutricional de la población, la mortalidad es escasa. No hay tratamiento específico y la infección se adquiere por mordedura o contacto con la sangre de los animales infectados. La vacuna del virus de vaccinia (antivariólica) protege contra la enfermedad. Aparece entonces un buen motivo para sostener el uso de la vacuna, aunque el principal proviene del temor a un atentado terrorista.

¿Se destruirán los stocks de viruela alguna vez?

Es una pregunta difícil de responder para un observador externo, pero no existen razones científicas que lo justifiquen. Si, como veremos, ya existe en los Estados Unidos un plan de emergencia frente a un ataque con el virus de viruela, y las dosis suficientes de vacuna para inmunizar a toda la población. ¿Porqué no conservar solamente el DNA viral?, ¿Porqué es

necesario preservar todos los aislamientos listos para infectar? ¿O es que se apelará al precepto bíblico: "ojo por ojo, diente por diente"?

Según consignamos antes, el año 2002 era la fecha pactada para la destrucción de los stocks de viruela almacenados en el CDC, como resultado de la recomendación de los expertos de la OMS y la aceptación de los funcionarios de la administración Clinton (5). Sin embargo, la administración Bush decidió, después del ataque terrorista a las torres gemelas (World Trade Center), suspender la destrucción de los mismos por tiempo indefinido. Los objetivos que deberán lograrse antes de proceder a la destrucción, dijeron los funcionarios, serán los siguientes : a) aprobación por el FDA (Food and Drug Administration) de dos drogas antivirales, b) obtención de una vacuna que pueda ser administrada a toda la población c) desarrollo de un test de diagnóstico de la enfermedad d) creación de detectores ambientales e) entrenamiento para investigadores de la sanidad aptos para reconocer la presencia de cepas de viruela genéticamente alteradas. Sólo con detenernos en el requerimiento expresado en el punto **b** (obtención de una vacuna segura para toda la población), podríamos pronosticar que la destrucción de los stocks se llevará a cabo en un período incierto no menor de 20 años.

El virus de vaccinia cada vez más peligroso

El origen del virus de vaccinia que se usa 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, quizá alguna infectada con viruela. Hay quienes arriesgan que se trata de un orhopox virus extinguido en la naturaleza que sobrevivió en los laboratorios de investigación.

El gobierno de los estados Unidos ha realizado una estimación que son necesarias 40 millones de dosis de vacuna para cubrir a su población ante una eventual acto bioterrorista de liberación del virus de viruela.

Que este evento tenga o no una alta probabilidad de ocurrencia, no lo discutiremos aquí. Solamente nos vamos a concentrar en los efectos adversos asociados a la vacunación antes y después de imaginar una guerra con agentes biológicos.

La erradicación de la viruela en el mundo se consiguió con la aplicación masiva de una vacuna liofilizada producida sobre la panza de terneras. Aunque se utilizaron diferentes cepas vacunales, en Estados Unidos la cepa de Vaccinia utilizada fue la New York City. La vacuna dejó de fabricarse en 1983, pero en el CDC se conserva gran cantidad de stock almacenado. Esta vacuna contenía virus "vivo" no inactivado que al ser inoculado intradérmicamente en el brazo producía una pústula en el lugar de la inoculación que evolucionaba desde eritema localizado hasta vesícula, pústula y costra. La sola formación de la pústula es suficiente para asegurar inmunidad contra la viruela por períodos relativamente prolongados.

Como se trataba de virus vivo había que tener cuidado de no transmitirlo a otras partes del cuerpo porque se podía producir una vaccinia generalizada. La vacuna presentaba además otros riesgos, sobre todo en pacientes con problemas de piel como eczemas y en personas inmunosuprimidas, en las que se producía una vaccinia generalizada. Por cada millón de personas vacunadas ,1000 tenían reacciones, y se estimaba que 7 a 9 personas morían por efecto de la vacunación, en especial, los niños pequeños por encefalitis. Como el virus está presente en las lesiones desde el día 3 al 14 después de la infección, el vacunado puede poner en peligro a las personas que lo rodean, en especial a los inmunosuprimidos.

¿Qué pasa en la actualidad?. Por recomendación de la OMS se ha elegido como cepa vacunal a la denominada Lister, en primer lugar, y en segundo lugar a la mencionada cepa New York. Debido a los efectos colaterales que tenía la vacuna preparada en terneros se buscaron otros sustratos para su producción, como los huevos embrionados y cultivos celulares (6).

La utilización de la vacuna en personal de la salud, militares y otros grupos ha sido cuidadosamente controlada por el ó los responsables del programa de vacunación en los Estados Unidos. Este seguimiento minucioso ha llevado a que el CDC informe sobre las contraindicaciones de la vacuna que se mencionan a continuación:

La vacuna no debe suministrarse a personas con las siguientes condiciones:

1. HIV positivos
2. personas que reciben tratamiento con esteroides
3. mujeres embarazadas
4. madres que están amamantando
5. personas con dermatitis atópica
6. personas con eczema
7. menores de 1 año
8. personas con cáncer inmunosuprimidos por drogas
9. transplantados
10. condiciones cardíacas.



Debido a la observación de complicaciones cardíacas en vacunados, el 31 de marzo de 2003 el

CDC publica:

HOJA INFORMATIVA TEMPORAL SOBRE LA VIRUELA

VACUNA CONTRA LA VIRUELA Y PROBLEMAS DEL CORAZÓN

“Un seguimiento cuidadoso del progreso de las vacunaciones contra la viruela en meses recientes sugiere que la vacuna puede causar inflamación del corazón (miocarditis), inflamación de la membrana que cubre el corazón (pericarditis) y/o una combinación de esos dos problemas (miopericarditis). Los expertos están estudiando esto en más profundidad. También se han presentado casos de dolor en el corazón (angina) y ataque cardíaco después de la vacunación contra la viruela. Sin embargo, no se conoce en este momento si la vacuna contra la viruela causó estos problemas o si estos ocurrieron por cuenta propia (los problemas del corazón son muy comunes). Los expertos también están investigando esto.

Los incidentes reportados no son necesariamente causados por la vacuna y algunos de ellos o todos pueden haber sido una coincidencia.

Como una medida de precaución, las personas que han sido diagnosticadas por un médico con una enfermedad del corazón, con o sin síntomas, no deben recibir la vacuna contra la viruela en este momento, mientras los expertos continúan con sus investigaciones. Entre estas condiciones se encuentran conocidas enfermedades cardíacas, entre ellas:

1. infarto de miocardio previo (ataque al corazón)
2. angina (dolor en el pecho causado por falta de flujo sanguíneo al corazón)
3. insuficiencia cardíaca congestiva
4. miocardiopatía (inflamación del músculo del corazón que impide su correcto funcionamiento)
5. apoplejía o accidente isquémico transitorio
6. síntomas parecidos a la apoplejía pero sin daño permanente
7. dolor en el pecho o falta de aliento con la actividad (como subir escaleras)
8. otras condiciones del corazón que estén bajo tratamiento de un médico.

Además, usted NO debe vacunarse contra la viruela si tiene tres o más de los siguientes factores de riesgo:

1. Un médico le dijo que usted tiene presión sanguínea alta.
2. Un médico le dijo que usted tiene colesterol sanguíneo alto.
3. Un médico le dijo que usted tiene diabetes o nivel de azúcar alto en la sangre.



Para concluir, yo me pregunto ¿quién de nosotros se ofrece como voluntario para vacunarse?. En tanto, laboratorios privados continúan fabricando vacuna para “proteger” la salud de los americanos amenazados por las armas biológicas. No parece un buen negocio para el pueblo pero sí para algunos políticos e inversores.

Bibliografía.

1. Coto, Celia E. “La viruela: peste del pasado amenaza del presente”
Química Viva. Revista electrónica. Vol 1. N 1. 2002.
2. James W. LeDuc* and Peter B. Jahrling. “Strengthening National Preparedness for Smallpox: an Update”
*Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA; †United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA
3. *Vaccines* de Stanley A. Plotkin y Walter A Orenstein, W.B.Saunders Company 1999. Chapter 6.
4. Bibliografía sobre el Monkey pox se encuentra en la dirección del CDC <http://www.cdc.gov>
5. Kaiser Daily Health Policy Report. November 15, 2001
6. Todo lo referente a vacuna y reacciones adversas se puede consultar en el sitio del CDC <http://www.cdc.gov>

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**
Vol. 2, número 2, 2003
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

PROTEÍNAS A MEDIDA

por Juan Carlos Calvo

Dr. en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Profesor Adjunto del Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA. Investigador Independiente, CONICET. Director del Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA.

Recibido el 4 de julio de 2003/ Aceptado 22 de julio de 2003

El otro día, mientras viajaba en subte, observé a una persona, probablemente un profesor o maestro, corrigiendo lo que parecía ser una composición cuyo tema era "Zapatillas a medida". En ese momento, se me ocurrió el título para este comentario: "Proteínas a medida".

Evidentemente, la gran variedad de seres humanos hace necesaria la existencia de productos hechos "a medida": trajes, vestidos, zapatillas, etc.

Y esto cumple la función de cubrir las necesidades de cada individuo, haciendo la vida más confortable.

Y esto no es algo nuevo. Desde que el hombre se irguió sobre sus pies y observó a su alrededor, encontró animales y vegetales para su consumo, y también, para que lo ayudaran en su trabajo, por ejemplo: como animales de tiro.

Y esto le trajo bienestar, tanto a él como a sus vecinos. Pero, el avance trajo consigo nuevas necesidades, algunas vitales y otras que tenían que ver con deseos de progresar y estar mejor.

Con esto surge la Biotecnología, el uso de organismos biológicos o sus componentes, para el desarrollo de productos o la prestación de servicios. Y, así, combinó especies vegetales obteniendo especies híbridas con características particulares: resistencia a las heladas, a plagas, mejor sabor, aspecto, etc., por supuesto sin saber cómo ocurría esto. Y su curiosidad aumentó, dando paso a la investigación científica con avance en el conocimiento, y en paralelo, el desarrollo tecnológico.

Pasaron los años y el conocimiento avanzó desde el exterior hacia el interior de los organismos, llegando al nivel molecular.

Con el estudio de la manera de manejar la información por las células se llegó a la posibilidad de manipular dicha información. Y surgió la Ingeniería Genética, de la mano de la Biología Molecular, que no es más que la Química de la Vida (Química Biológica) aplicada especialmente a los procesos relacionados con el material genético y anexos.

Llegamos a la era del “Proyecto Genoma Humano”, con el desciframiento completo de nuestra información genética. O casi completo, porque la actividad dentro de nuestras células la lleva a cabo el conjunto de proteínas, organizadas en caminos metabólicos, entrelazados entre sí dando lugar al llamado “Metaboloma”.

Como ocurrió en los inicios de la actividad humana, el mayor conocimiento de los sistemas llevó al deseo de mejorarlos, para que sirvieran mejor a las necesidades de los individuos.

Y del “Proyecto Genoma” se pasó al “Proyecto Proteoma”, o “Genómica Funcional”, visto que si la información contenida en el genoma no se expresa en otras moléculas funcionales (por ejemplo: proteínas) de nada servirá. Y el mejor conocimiento de la relación entre estructura, conformación espacial y función llevó a ese deseo, desde el comienzo insertado en el ser humano, de modificar la naturaleza para su bienestar, a querer rediseñar las proteínas, modificando la actividad de las mismas.

Evolución, la adaptación gradual a una presión selectiva, es la manera que tiene la naturaleza de responder a los variados desafíos ambientales. El principio evolutivo puede describirse como ciclos repetidos de introducción de mutaciones en el genoma, selección de fenotipos beneficiosos y pasaje de las mutaciones seleccionadas a la descendencia, en forma directa (propagación vegetativa) o vía recombinación genética con una pareja (propagación sexual).

Los productos de una evolución Darwiniana son aparentes a todo nivel, desde la impresionante diversidad en los organismos vivientes hasta las moléculas proteicas individuales. Los científicos que desean rediseñar estas mismas moléculas, están implementando su propia versión del algoritmo evolutivo. La llamada “evolución dirigida” que nos permitirá explorar funciones enzimáticas no requeridas por el medio ambiente natural y aquellas cuyas bases moleculares no se comprenden en detalle.

En definitiva, podríamos decir que es una forma de modificar la evolución, actuando directamente sobre las moléculas en cuestión, ya sea desde el comienzo modificando la información genética o, *a posteriori*, modificando directamente a la molécula de interés.

Si se reconstruye la historia evolutiva de las proteínas actuales, aprendemos que son moléculas altamente adaptables, al menos en la escala del tiempo evolutivo. Muchas de las enzimas que catalizan reacciones diferentes han evolucionado en forma divergente a partir de un ancestro común, adquiriendo capacidades muy diversas por procesos de mutación al azar, recombinación y selección natural. También sabemos que las enzimas que comparten una función común, por ejemplo, catalizan un paso particular en un camino metabólico, además de su estructura tridimensional pueden exhibir propiedades muy diferentes (estabilidad, solubilidad, tolerancia a pH, etc.) dependiendo de dónde se las encuentre.

¿Por qué la necesidad de una evolución dirigida?

Cuando se utilizan enzimas naturales para una aplicación industrial, para servir como catalizadores en síntesis químicas o como aditivos en detergentes de lavandería, se descubre que no se adaptan bien para estas tareas. Debido a la poca solubilidad del sustrato, ruptura de productos inestables o reacciones competidoras, las condiciones para una reacción enzimática pueden no ser apropiadas

para una aplicación a gran escala.

Es posible producir nuevas enzimas en organismos recombinados, alterando la secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, las propiedades mediante modificaciones apropiadas a nivel del ADN. Sin embargo, la experiencia demuestra que los cambios en las propiedades enzimáticas provienen de la acumulación de pequeños ajustes, muchos de los cuales están distribuidos a lo largo de distancias significativas en la molécula.

La evolución es una herramienta poderosa con habilidad comprobada para alterar la función enzimática y, especialmente, para ajustar las propiedades enzimáticas. Es un algoritmo que puede ser implementado en el laboratorio para rediseñar. El reto es comprimir la escala de tiempo a meses, o aún semanas.

A partir de este momento, pasamos a temas un poco más específicos y, tal vez, algo más complicados. Espero que las figuras ayuden a comprender un poco mejor estos conceptos.

¿Cómo hacer esto?

En estos momentos, tenemos a nuestro alcance oportunidades sin precedentes para generar nuevas enzimas y biocatalizadores, utilizando técnicas sofisticadas que mutan, recombinan y amplifican las secuencias de ácidos nucleicos.

Un experimento típico de evolución dirigida comienza con la selección de una biblioteca de secuencias de ADN parental que codifique para proteínas que involucran, en parte, la propiedad buscada. La diversidad de secuencias exploradas es, luego, incrementada mediante el paso de mutagénesis, introduciendo mutaciones nucleotídicas puntuales al azar y/o por recombinación de fragmentos de ADN. El paso de mutagénesis y fragmentación deja a todas, con pocas excepciones, las secuencias inactivas. Estas secuencias de ADN son, luego, ligadas a un vector de expresión y se transforman células de *Escherichia coli*. Luego, se emplea un procedimiento de búsqueda (“screening”) para aislar las pocas células transformadas que contienen las secuencias codificantes para enzimas activas o proteínas funcionales. Estas secuencias seleccionadas son, luego, amplificadas y se repite el ciclo de mutagénesis, búsqueda y amplificación, múltiples veces, hasta que se encuentran las proteínas con la función o propiedad deseadas.

Estrategias para las mutaciones.

La mutagénesis de un gen puede realizarse en forma diseminada a lo largo de una secuencia o dirigida a una región en particular.

La primera puede lograrse mediante la llamada “PCR con predisposición a errores” (“error-prone PR”) o mediante la tecnología de “mezclado de ADN” (“DNA-shuffling”).

En la primera, el gen de interés es amplificado con una ADN polimerasa en condiciones donde la fidelidad transcripcional es baja y se introducen errores en las copias generadas. Dado que la mayoría de las mutaciones no son beneficiosas, dos mutaciones favorables se acumularán en el mismo gen, solamente con baja probabilidad y muchas mutaciones beneficiosas serán

enmascaradas por las deletéreas. Para combinar varias mutaciones deseables, se utiliza un segundo método, donde el conjunto de fragmentos de ADN generado por la PCR es digerido por DNasa I, una enzima que corta en forma inespecífica, y se reensamblan los trozos por PCR. En principio, cada mutación puede ser recombinada y propagada individual e independientemente de otras mutaciones. Este proceso se asemeja al “crossing-over” que tiene lugar en los cromosomas de los organismos vivos.

Para introducir mutaciones solamente en una región particular de un gen, puede utilizarse la mutagénesis en *cassette* por PCR. El fragmento de ADN conteniendo el punto mutado es recortado entre dos sitios de restricción flanqueantes. Luego, un producto de PCR, que puede ligarse exactamente en estos sitios de restricción, se genera con un cebador degenerado. Este iniciador se sintetiza químicamente para llevar una mezcla al azar de nucleótidos en uno o más codones y la proteína codificada lleva, por lo tanto, un conjunto de aminoácidos al azar, en esta posición particular. Desafortunadamente, un codón completamente formado al azar exhibirá una fuerte desviación hacia algunos aminoácidos que son codificados por más de un codón, por ejemplo, el aminoácido serina es codificado por seis codones diferentes, mientras que triptófano está codificado por un solo codón), siendo también difícil evitar la incorporación de un codón de terminación. La solución a este problema es usar trinucleótidos presintetizados (codones) para todos los 20 aminoácidos como bloques de construcción para la síntesis de ADN de los oligonucleótidos, en lugar de utilizar los mononucleótidos convencionales. Estos bloques pueden ser mezclados en cualquier proporción y solamente se necesita agregar aquellos trinucleótidos que el investigador desea en esta posición en la secuencia proteica.

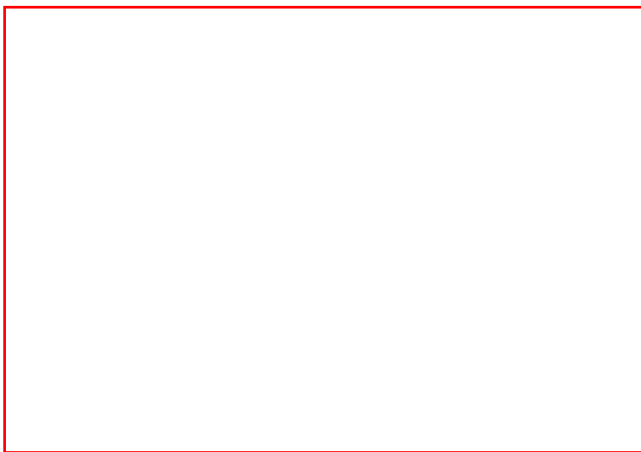


Figura 1.- Estrategias para mutagénesis, con el fin de obtener las modificaciones localizadas o en genes enteros. En el panel (A) se muestra en forma esquemática el proceso de PCR “sujeto a error”, como una estrategia para la distribución no dirigida de mutaciones en un gen de interés. Se muestran dos tipos de mutaciones, las favorables (cuadrados) y las desfavorables (círculos). En ciclos sucesivos de PCR, se introducen más mutaciones de cada tipo y, generalmente, las moléculas contendrán alguna de cualquier tipo. Así, el efecto benéfico de las mutaciones favorables puede ser opacado, completamente, por la presencia de las desfavorables. Una posible solución a este problema, se muestra en el panel (B) y se conoce como “mezclado de ADN”. El producto de PCR se corta en pequeños trozos, utilizando la enzima DNasa I y se reensamblan, subsecuentemente, mediante PCR. Las mutaciones quedan, por lo tanto, cruzadas y los genes con el mayor número de mutaciones favorables pueden ser enriquecidos

por selección. El panel (C) muestra el principio de PCR utilizando un “*primer* degenerado”. Este “*primer*” o iniciador contiene una mezcla de todos los cuatro posibles nucleótidos (abreviados en la letra N) en una posición determinada o, alternativamente, una mezcla de codones ensamblados a partir de trinucleótidos. Las proteínas sintetizadas a partir de este gen llevarán, por lo tanto, un grupo “*randomizado*” de aminoácidos en esta posición. **Ver [Figura 1 tamaño completo](#)**

Estrategias para seleccionar las proteínas.

a) “*Display*” ribosomal:

Se transcribe una biblioteca de ADN, *in vitro*, a ARN mensajero utilizando ARN polimerasa. Esta biblioteca de ARN mensajero puede traducirse a proteína, utilizando la maquinaria bacteriana (extracto bacteriano S30). Luego de detener la traducción por enfriamiento y aumentando la concentración de magnesio, el ARN mensajero (ARNm), el ribosoma y la proteína recién

sintetizada formarán un complejo ternario. Los complejos ribosomales deseados se seleccionan por afinidad, de la mezcla de traducción, por unión de la proteína nativa al antígeno inmovilizado. Los complejos ribosomales no específicos se eliminan por lavado exhaustivo. Los complejos ribosomales unidos se eluyen con antígeno y se puede recuperar el ARNm y transcribirlo en forma reversa obteniendo cADN (ADN copia) mediante la técnica de RT-PCR. Este cADN puede utilizarse en el próximo ciclo de enriquecimiento o puede analizarse por secuenciación.

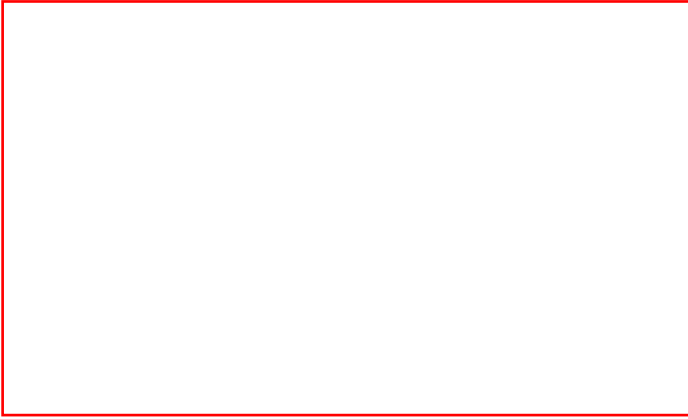


Figura 2.- Principio de búsqueda y selección de una proteína ligadora, a partir de una biblioteca de ADN, utilizando la tecnología del “display” ribosomal.

Ver [Figura 2 tamaño completo](#)

b) Ensayo de complementación de fragmentos proteicos (PCA), para la selección simultánea de interacciones proteína/proteína.

En este método, una biblioteca proteica puede ser analizada contra otra biblioteca proteica. Esto es útil para obtener un mapa de proteínas interactuantes dentro de un organismo pero también, para identificar ligandos de una biblioteca de anticuerpos.



Figura 3.- Principio del ensayo de complementación de fragmentos proteicos: (A) Enzima dihidrofolato reductasa murina (DHFR), nativa, mostrada como diagrama de “cinta”. Esta enzima es importante para la biosíntesis de purinas, timidilato, metionina y pantotenato. En esta figura, también se muestra al cofactor folato, en un modelo espacial. Si esta enzima se parte, genéticamente, en dos (B), los fragmentos no se reasociarán y se perderá la actividad. Por lo tanto, se impide la división y el crecimiento celular en un medio mínimo. La fusión de los fragmentos individuales a dominios proteicos, formando un complejo (C) puede dirigir el reensamblado de los fragmentos de DHFR, recuperándose la actividad (D). Este sistema se utiliza, en la actualidad, para seleccionar anticuerpos scFv, a partir de una biblioteca de ADN, contra “blancos” definidos, fusionados a un fragmento de la DHFR (E).

Ver [Figura 3 tamaño completo](#)

Existen cuatro requerimientos para una evolución dirigida exitosa: 1) la función deseada debe ser físicamente posible, 2) la función debe ser, también, biológica o evolutivamente posible, 3) también debe ser posible obtener bibliotecas de mutantes, lo suficientemente complejas como para contener mutaciones beneficiosas y, 4) debe existir una forma rápida de seguimiento o selección que refleje la función deseada.

Recientemente se ha obtenido un gran éxito en la obtención de enzimas con utilidad industrial, con una mejora sustancial en la actividad y termoestabilidad, como así también de vacunas y productos farmacéuticos.

Cada vez cobra más realidad la afirmación: “el hombre se ha convertido en la primera criatura de la evolución, capaz de modificar la evolución”. El futuro dirá hasta dónde se podrán diseñar proteínas “a medida” de las necesidades que vayan surgiendo.

Por ahora, nos encontramos como nuestro antecesor prehistórico: asombrados ante la enorme vastedad de posibilidades y dispuestos a escribir un nuevo capítulo en la historia de los avances científicos.

Solamente resta esperar que todo sea para bien.

Bibliografía consultada:

-Modelling DNA mutation and recombination for directed evolution experiments. Gregory L. Moore and Costas D. Maranas J. theor. Biol. (2000) 205: 483-503

-Directed evolution with fast and efficient selection technologies. Ekkehard Mössner and Andreas Plückthun Chimia (2001) 55: 324-328

-<http://www.che.caltech.edu/groups/fha/Enzyme/directed.html> Directed enzyme evolution. Frances H. Arnold.

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Vol. 2, número 2, 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



QUIMIOQUINAS, proteínas atractivas y promiscuas que empiezan a destacarse en el escenario de la inflamación y la inmunidad

por la Dra Rosa Wainstok
Profesora de la Universidad de Buenos Aires
Investigadora del CONICET

Recibido 8 de julio de 2003/ Aceptado 25 de julio de 2003

Las quimioquinas son moléculas tan atractivas como promiscuas, que dirigen la migración leucocitaria e intervienen en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos fundamentalmente en procesos inmunitarios e inflamatorios (1,2). Son proteínas de bajo peso molecular (de aproximadamente 70 aminoácidos), secretadas por diversas células e involucradas en la migración y activación de leucocitos, en los procesos de angiogénesis, en la producción de colágeno y en la proliferación de los precursores hematopoyéticos. Se clasifican de acuerdo a la posición relativa de sus residuos cisteína N-terminal. Así, cuando los dos residuos de cisteína están separados por un aminoácido se designan como quimioquinas-CXC (CXC-chemokines) y cuando ambas cisteínas están unidas se las denomina quimioquinas-CC (CC-chemokines). Después del rápido descubrimiento de nuevas quimioquinas, uno de los problemas que se presentó fue que varios grupos de investigación informaban acerca de la misma molécula con distintos nombres. Esto llevó a una confusión entre los científicos que trabajaban activamente en este campo de investigación. Así en el "Keystone Symposium on Chemokines and Chemokine Receptors " realizado en enero de 1999, en Keystone, CO. A. Zlotnik y O. Yoshie propusieron un nombre sistemático para todas las quimioquinas y sus receptores basándose en la estructura proteica y en su locus génico agrupándolas en cuatro familias (**Cuadro 1**) (Los efectos biológicos de las quimioquinas son producidos por su unión a receptores que se expresan sobre la superficie celular y están acoplados a proteínas G. Estos receptores son promiscuos, siendo por lo tanto capaces de unir distintas quimioquinas **(Fig.1)** y producir así efectos biológicos diferentes.

Cuadro 1

Quimioquina /Receptor CXC

Nombre sistemático	Ligando humano	Ligando murino	Receptor de quimioquina
CXCL1	GRO α / MGSA- α	GRO/ KC	CXCR2, CXCR1
CXCL2	GRO β / MGSA β	GRO/ KC	CXCR2

CXCL3	GRO γ / MGSA - γ	GRO/ KC	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4	Desconocido
CXCL5	ENA - 78	LIX	CXCR2
CXCL6	GCP - 2	CK α - 3	CXCR1 , CXCR2
CXCL7	NAP - 2	Desconocido	CXCR2
CXCL8	IL - 8	Desconocido	CXCR1 , CXCR2
CXCL9	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	IP - 10	IP - 10	CXCR3
CXCL11	I - TAC	Desconocido	CXCR3
CXCL12	SDF -1 α / β	SDF -1	CXCR4
CXCL13	BLC/ BCA -1	BLC/ BCA -1	CXCR5
CXCL14	BRAK/ bolequina	BRAK	desconocido
CXCL15	desconocido	Lungquina	desconocido

Quimioquina/ Receptor C

XCL1	Linfotactina	Linfotactina	XCR1 SCM 1 α /ATAC
XCL2	SCM-1 β	desconocido	XCR1

Quimioquina/ Receptor CX₃C

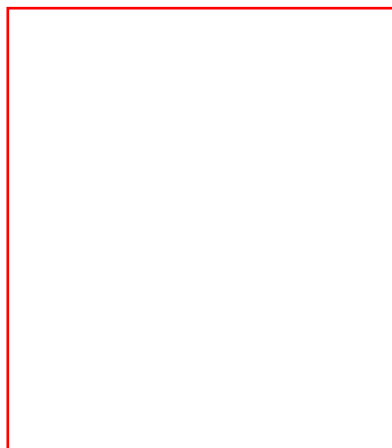
CX3CL1	Fractalquina	Neurotactina	CX3CR1
--------	--------------	--------------	--------

Quimioquina/ Receptor CC

CCL1	I - 309	TCA - 3, P500	CCR8
CCL2	MCP - 1 / MCAF	JE	CCR2
CCL3	MIP - 1 α / LD78 α	MIP - 1 α	CCR1, CCR5
CCL4	MIP - 1 β	MIP - 1 β	CCR5
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL6	Desconocido	C10, MRP - 1	Desconocido
CCL7	MCP - 3	MARC	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP - 2	MCP - 2	CCR3
CCL9 / 10	Desconocido	MRP - 2, CCF18, MIP - 1 χ	Desconocido
CCL11	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
CCL12	Desconocido	MCP - 5	CCR2
CCL13	MCP - 4	Desconocido	CCR2, CCR3
CCL14	HCC - 1	Desconocido	CCR1
CCL15	HCC-2 / Lkn-1 / MIP-1 δ	desconocido	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4 / LEC	LCC - 1	CCR1
CCL17	TARC	TARC	CCR4
CCL18	DC-CK1/PARC AMAC-1	desconocido	desconocido
CCL19	MIP-3 β / ELC/ exodus-3	MIP-3 β / ELC/ exodus-3	CCR7
CCL20	MIP-3 α / LARC/ exodus-1	MIP-3 α / LARC/ exodus-1	CCR6
CCL21	6Ckine/SLC/ exodus-2	6Ckine/SLC/ exodus-2/TCA	CCR7
CCL22	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	MPIF-1	desconocido	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxina-2	desconocido	CCR3

CCL25	TECK	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	desconocido	CCR3
CCL27	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC ESkina	CCR10

Las quimioquinas son redundantes en su acción sobre las células blanco, ninguna es activa sobre una única población de leucocitos, y usualmente, una población de leucocitos posee receptores y responde a más de una quimioquina. Como se menciona más arriba, la interacción de las quimioquinas con sus receptores se caracteriza porque la mayor parte de los receptores interaccionan con múltiples ligandos y la mayor parte de los ligandos interaccionan con más de un receptor (**Fig.1**). A continuación se señala la nomenclatura propuesta para todos los ligandos y receptores descriptos, junto con sus nombres primitivos que aún se emplean en la bibliografía.



[Ver Figura 1 tamaño completo](#)

¿Cómo intervienen en el tráfico leucocitario?

La migración de leucocitos a sitios inflamatorios depende de una cascada de eventos, mediados en parte, por quimioquinas y sus receptores y regulados por una variedad de señales. Se pueden distinguir cuatro pasos fundamentales en el proceso de extravasación de leucocitos:

1) Distintas moléculas proinflamatorias como LPS (lipopolisacárido), TNF(tumor necrosis factor) e IL-1 (interleuquin-1) pueden activar a las células endoteliales para que expresen moléculas de adhesión como por ejemplo selectinas, las cuales son capaces de unirse a moléculas de tipo mucinas que se expresan sobre los leucocitos, produciéndose así el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio vascular (**Fig. 2**)

2) Las células endoteliales secretan factores quimioattractivos (quimioquinas) que se unen a sus receptores sobre la superficie de los leucocitos y activan a las integrinas, resultando en una firme adhesión entre leucocitos y células endoteliales (**Fig. 2**)

3) Debido a que las integrinas se unen a moléculas de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas que se expresan sobre el endotelio vascular (3,4), los leucocitos migran a través de las células endoteliales

interactuando con la molécula de adhesión PECAM-1 (platelet endothelial-cell adhesion molecule (CD31)) expresada tanto sobre los leucocitos como sobre las membranas intercelulares de las células endoteliales **(Fig.2)**



[Ver Figura 2 tamaño completo](#)

4) Los leucocitos migran siguiendo un gradiente de quimioquinas, el cual se genera por liberación de las mismas por células endoteliales y macrófagos como consecuencia de una injuria producida en el tejido (5). Así, los leucocitos llegan selectivamente al lugar donde se produce el proceso de inflamación, dependiendo del tipo de quimioquina que se secrete.

La quimioquina fractalquina fue la primera quimioquina-CX3C que se describió, es estructuralmente distinta de otros tipos de quimioquinas y su nombre sistemático es CX3CL1. Se expresa como una molécula transmembrana y su expresión puede ser inducida marcadamente sobre células endoteliales por citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 y IFN- γ (interferon γ) o con el ligando CD40. La fractalquina soluble puede ser liberada de la superficie de la célula por proteólisis exhibiendo actividad quimiotáctica eficiente para monocitos y células T (6). En el proceso de extravasación de leucocitos cumple una función dual actuando a la vez como molécula de adhesión y como quimioquina. La interacción entre la fractalquina y su receptor, CX3CR1, puede producir la adhesión celular sin involucrar a las selectinas, pudiendo también producir el proceso de transducción de señales para la activación de las integrinas (6).

El reclutamiento de leucocitos depende de la especificidad de las quimioquinas producidas en el sitio de inflamación

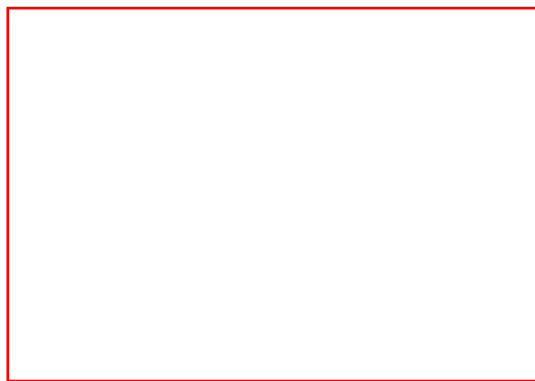
La IL-8 (interleuquina 8), actualmente CXCL8, y el MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), actualmente CCL2, son las quimioquinas más importantes para el reclutamiento de células polimorfonucleares (PMN) y monocitos, respectivamente. En la inflamación aguda el infiltrado es inicialmente de PMN y después de 24 a 48 horas predominan los macrófagos. Este proceso de transición entre estos dos tipos de leucocitos estaría relacionado a la cinética y propiedades funcionales de las quimioquinas IL-8 y MCP-1 respectivamente. Cuando los PMN y otras células son estimuladas por citoquinas inflamatorias, la IL-8 es producida tempranamente y por 24 horas, reclutando y activando localmente más PMN. Una prolongada producción de IL-8 puede producir una alta concentración de esta quimioquina en los vasos, lo cual inhibe la adhesión de PMN al endotelio y la extravasación de los mismos (7). La producción de MCP-1 está usualmente retardada pero sostenida por varios días, su producción no sensibiliza a las células y conduce a un tardío reclutamiento

de monocitos (8,9). Es interesante destacar que la estimulación de neutrófilos con citoquinas inflamatorias por varias horas produce selectivamente MCP-1 y no IL-8 observándose además que el complejo IL-6-sIL-6Ra puede activar a las células endoteliales para secretar IL-8 y MCP-1 (10). Estas interrelaciones entre citoquinas y quimioquinas se producen en todos los procesos biológicos donde intervienen estas proteínas y es lo que hace tan dificultoso su estudio in vivo.

Regulación de la función de células endoteliales y células dendríticas por quimioquinas

Quimioquinas y células endoteliales. Durante mucho tiempo se consideró que las células endoteliales, que cubren la pared interna de los vasos sanguíneos, cumplían una acción pasiva, como si fuese un papel celofán que no deja pasar la sangre. Actualmente se sabe que participan en reacciones inmunes e inflamatorias produciendo y respondiendo a citoquinas y quimioquinas. Estos mediadores polipeptídicos solubles sirven para la comunicación entre células, tejidos y órganos. Las quimioquinas son fundamentales en el proceso de reclutamiento de leucocitos y son producidas por las células endoteliales en respuesta a moléculas involucradas en reacciones inflamatorias, inmunidad y trombosis. El repertorio de quimioquinas producidas por las células endoteliales incluye miembros de las familias CXC- (IL-8, epithelial-cell derived neutrophil-activating protein 78 (ENA-78)), growth related oncogen a (GRO-a), interferon-inducible protein 10 (IP-10) y CC- (MCP-1, MCP-3, RANTES) con la mayor cantidad de estudios focalizados sobre quimioquinas típicas como IL-8 y MCP-1. En general el espectro de acción de las quimioquinas se restringe a leucocitos, sin embargo hay evidencias que sugieren que esta superfamilia de mediadores inflamatorios pueden afectar la función de las células endoteliales y nerviosas (11, 12)

Quimioquinas y Células Dendríticas Uno de los desarrollos recientes más interesantes en la biología de las quimioquinas es el estudio de la interrelación entre quimioquinas y células dendríticas (**Fig. 3**).



[Ver figura 3 tamaño completo](#)

Las células dendríticas (centinelas del sistema inmune) son las células presentadoras de antígenos más eficientes y son capaces de producir quimioquinas in vitro e in vivo constitutivamente o en forma inducida. Los progenitores de las células dendríticas entran a la sangre desde la médula ósea y se instalan en los tejidos no linfoides, donde se desarrollan como células dendríticas inmaduras (**Fig. 3**) con alta capacidad de captar y procesar antígenos y baja capacidad de estimular células T. La producción local de citoquinas inflamatorias

como TNF, IL1, GM-CSF, CD40L (**Fig. 3**) y el encuentro con un antígeno promueve la maduración de las células dendríticas y como consecuencia la migración de las mismas hacia los nódulos linfoides regionales (13). Estas células maduras, se caracterizan por expresar moléculas coestimuladoras y poseer alta capacidad para presentar antígenos que estimulan la proliferación de células T. Los receptores de quimoquinas se expresan sobre las células dendríticas en forma específica. Así, las células dendríticas inmaduras expresan el receptor CCR6 y responden a la quimoquina CCL20/MIP3a/LARC (**Fig. 1, Fig. 3**) in vitro. Cuando estas células captan el antígeno, comienzan a madurar y expresan el receptor CCR7 el cual es fundamental para la migración hacia los nódulos linfoides ya que en los mismos se secretan las quimioquinas CCL20/MIP3b/ELC y CCL21/6CKine/SLC (**Fig. 1, Fig. 3**) cuyo receptor es CCR7. CCL20 y CCL21 forman un gradiente que hace migrar a las células dendríticas maduras a los nódulos linfoides, donde son capaces de activar células T de antígenos específicos (14). Estos y otros estudios (8) sugirieron que la expresión de receptores de quimioquinas en las células dendríticas, es un fenómeno específico que posee una función durante la respuesta inmune.

Referencias

1. Mantovani A , 1999. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunology Today* 20 : 254-257
2. Zlotnik A ,Yoshie O, 2000. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121-127
3. Springer T.A ,1994. Traffic signal for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314
4. Bevilacqua M P, Nelson R M, 1993. Selectins. *J. Clin. Inv.* 91: 379-387
5. Newman P J, 1997. The biology of PECAM-1. *J. Clin. Inv.* 100: S25-S29
6. Umehara H, Bloom E T , Okazaki T, Domae N, Imai T, 2001. Fractalkine and vascular injury. *TRENDS in Immunology* 22: 602-607
7. Gimbrone M A,Obin M S, Brock A F, Luis E A, y col. 1989. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* 246: 1601-1603
8. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Foster R, Burgstahler R, Lipp M, Lanzavecchia A, 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.* 29: 1617-1625
9. Yamashiro S, Kamohara H, Yoshimura T, 1999. MCP-1 is selectively expressed in the late phase by cytokine-stimulated human neutrophils: TNF α plays a role in maximal MCP-1 mRNA expression. *J. Leukoc. Biol.* :65, 671-679 (1999)

10. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julián F, Mantovani A, Farnarier C, 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation TRENDS in Immunol. 24: 25-29
11. Mantovani A , Bussolino F, Introna M, 1997. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. Immunol. Today 18: 231-240
12. Asencio V C, Campbell I L, 1999. Chemokines in the CNS, plurifunctional mediators in diverse states. Trends Neurosci. 22: 504-512
13. Homey B , Muller A and Zlotnik A, 2002. Chemokines: Agents for the immunotherapy of cancer? Nature Reviews 2: 175-184
14. Kellerman S A , Hudak S , Oldham E R , Liu J and McEvoy, 1999. The CC chemokine receptor - 7 ligands 6 Ckine and macrophage inflammatory protein 3 beta are potent chemoattractants for in vitro and in vivo derived dendritic cells. J. Immunol. 162: 3859-3864

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Vol. 2, número 2, 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.arRevista **QuímicaViva**

Volumen 2, Número 2, septiembre de 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

BASES MOLECULARES DE LA MEMORIA

¿QUÉ NOS ENSEÑA EL CANGREJO?

Por Mariana Feld, Fernando Locatelli, Ramiro Freudenthal, Emiliano Merlo y Arturo Romano

Laboratorio de Neurobiología de la Memoria

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Recibido 2 de julio de 2003/ Aceptado 22 de julio de 2003

La investigación en el área de las bases moleculares del aprendizaje y la memoria ha tenido un enorme impulso en la década pasada y constituye una de las áreas de investigación más activas de la neurobiología de nuestros días. Este estudio se ha enriquecido gracias a la utilización de distintos modelos de memoria y de plasticidad neuronal, desarrollados tanto en vertebrados como en invertebrados, y diversos aspectos de este fenómeno sumamente complejo son abordados gracias a esta diversidad de paradigmas. A su vez, el desarrollo de novedosas metodologías en el ámbito de la biología molecular e inhibidores de distintas vías metabólicas ha permitido ampliar los conocimientos relacionados con los mecanismos moleculares implicados en estos procesos. Un ejemplo de la relevancia del uso de animales “simples” para estos estudios es la babosa marina *Aplysia*. Grandes avances en este campo se realizaron desde la década del 70 estudiando aprendizajes simples en esta especie que constituyeron la base de los trabajos de Erik Kandel¹¹, de la Universidad de Columbia, EEUU, por los cuales obtuvo el Premio Nobel de Medicina en el año 2000, en reconocimiento a sus descubrimientos sobre la transducción de señales en el sistema nervioso. Mucho hemos aprendido de la babosa de mar sobre cómo hace nuestro cerebro para formar memorias. Pero también hemos aprendido de otros animales. **¿Qué nos enseña el**

cangrejo?

Desde hace ya más de un siglo los crustáceos decápodos han sido utilizados como modelos en distintos paradigmas de aprendizaje y memoria, incluyendo gran diversidad de especies y comportamientos. Algunos cangrejos presentan una gran sensibilidad y agudeza visual. Objetos en movimiento que estimulan la parte superior de su campo visual desencadenan un limitado conjunto de respuestas defensivas estereotipadas, fácilmente discernibles y medibles. Esto presenta una ventaja adaptativa, ya que habitan en general en terrenos llanos (zonas costeras) y son predados por las aves, especialmente las gaviotas. A su vez, muestran una gran capacidad de aprendizaje para adecuar esas respuestas a distintas circunstancias y contextos. Aprovechando estas características, desde el año 1985 hemos desarrollado en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria un modelo de aprendizaje y memoria en estos animales. El protagonista de nuestra historia es *Chasmagnathus granulatus* (figura 1), un cangrejo semiterrestre que habita en las zonas de transición de agua dulce y salada de las costas del sur de Brasil, Uruguay y Argentina.

Figura 1



Fig 1: *Chasmagnathus Granulatus*, el crustáceo decápodo utilizado en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria como modelo de estudio

En el laboratorio se estudió la respuesta de escape del cangrejo a un estímulo visual de peligro, una figura rectangular opaca que pasa por encima de él. Con el fin de cuantificar y analizar dicha respuesta se desarrolló el “actómetro”, un dispositivo experimental totalmente automatizado (figura 2).

Figura 2



Figura 2: El actómetro. Consiste en un contenedor plástico donde se sitúa un animal, por encima del cual, se ubica la figura que puede moverse en un ángulo de 90° paralelamente a la superficie. Al contenedor se adhieren dos micrófonos que transducen la señal a una computadora, donde la misma es cuantificada. En el cuarto de entrenamiento, 40 actómetros permiten registrar la respuesta de escape de 40 cangrejos en forma simultánea.

Cada entrenamiento consiste típicamente en 15 ensayos (E) de presentación de la figura, con un intervalo entre ensayos (IEE) de 3 minutos. Ante la presentación reiterada del estímulo de peligro la respuesta de escape decrece, y es reemplazada por una respuesta críptica que consiste en permanecer contra el fondo del recipiente sin realizar movimiento alguno (“freezing”). Este protocolo de entrenamiento se denomina espaciado, y origina una memoria de largo término, puesta de manifiesto por una robusta retención que perdura por lo menos una semana (Figura 3).

Figura 3



Figura 3: Retención inducida por una sesión de entrenamiento espaciado de 15 E presentados en forma espaciada, con un intervalo entre ensayos (IEE) de 3 minutos. Los gráficos muestran el nivel de la respuesta de escape de animales entrenados (rojo) o expuestos solo al contexto (verde) en la sesión de entrenamiento (izquierda) y en la de evaluación de la memoria, 24 hs después del entrenamiento (derecha). La retención se define operativamente como la diferencia estadísticamente significativa entre la respuesta en el primer ensayo del grupo control y el grupo entrenado.

En esas condiciones los animales establecen una asociación entre el contexto y la señal de peligro, denominado aprendizaje contexto-señal¹⁶. Sin embargo, no se induce memoria contexto-señal (MCS) cuando se utiliza un protocolo de estimulación continua, sin intervalo entre ensayos. Esto es así aún cuando el tiempo total de estimulación sea el mismo que para un entrenamiento espaciado, aumentando así en forma notable el número de ensayos (alrededor de 1 000 E). La MCS es dependiente de la síntesis proteica y de ARN mensajero, dado que drogas que interfieren con los procesos de transcripción y traducción producen amnesia durante el período de consolidación de la memoria^{19,20} (este concepto será aclarado más adelante). En cambio, cuando se utiliza un entrenamiento masivo (IEE de 4 seg) se induce una memoria intermedia que sólo perdura entre 2 y 3 días, que no depende del contexto (memoria señal, MS), y que es independiente de la síntesis proteica¹⁰. La presencia de distintos tipos de memoria generados por los mismos estímulos e incluso de un protocolo de estimulación que no genera memoria de largo término, son herramientas muy valiosas para identificar procesos moleculares implicados específicamente en la formación de la memoria y controlar fenómenos inespecíficos que están siempre presentes en el entrenamiento, tales como estrés, estimulación visual y motora. Es extensivo el estudio de las características de estos tipos de memoria con respecto a la estímulo-especificidad¹⁵, contexto-especificidad²⁷, fenómenos de reconsolidación y extinción^{21, 22}, de

neurotransmisores y neuromoduladores involucrados, mediante el uso de agonistas y antagonistas^{2, 4, 29} y de la electrofisiología de neuronas implicadas en el aprendizaje y la memoria³⁰. Sin embargo, en este artículo nos centraremos en las vías de transducción de señales implicadas en la formación de la memoria.



¿Cuál es la base molecular de la memoria?

Desde fines del siglo XIX, a partir de observaciones en humanos, se desarrolló el concepto de consolidación de la memoria. Según esta teoría, aún hoy en boga a pesar de los múltiples embates recibidos, la memoria primero existe en una forma lábil, pasible de disrupción, y luego se consolida, pasando a una forma más estable y de larga duración. Distintos agentes pueden disrumpir la memoria antes de su consolidación, variando desde simples distractores a electroshock convulsivos o traumas craneanos. Es un fenómeno ubicuo, que ocurre tanto en humanos como en otros vertebrados e invertebrados. El estudio de la consolidación cobró una base bioquímica y molecular a partir del hallazgo de que inhibidores de la traducción y transcripción producen amnesia cuando se administran durante este período crítico. Este fenómeno probó ser prácticamente universal para las memorias de larga duración y muestra una analogía con los períodos críticos del desarrollo. Considerando este aspecto, se definió entonces la consolidación como un período durante el cual nuevas proteínas tienen que ser sintetizadas⁹. Esto llevó a postular que es necesaria la regulación de la transcripción génica durante la formación de la memoria. Las señales iniciadas por la actividad sináptica deben llegar al núcleo. En este punto debemos aclarar que nuestro enfoque de la memoria no es reduccionista. La memoria se entiende en términos neuronales como modificación de las conexiones sinápticas en los circuitos relacionados con la representación de las experiencias. No hay moléculas de la memoria sino mecanismos moleculares que permiten dichas modificaciones.

En el laboratorio hemos estudiado distintas vías de señalización intracelular involucradas en la consolidación de la memoria y en esta comunicación sinapsis-núcleo. A continuación sintetizaremos las líneas de investigación que hemos desarrollado.

vi

Dos períodos críticos para la consolidación: Proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA)

El papel de la PKA en procesos de plasticidad neuronal relacionados con la memoria fue inicialmente estudiado en los trabajos pioneros del grupo de Kandel, en *Aplysia*, y posteriormente corroborado en otros modelos de vertebrados e invertebrados. En *Chasmagnathus* se han obtenido las primera evidencias sobre la facilitación o bloqueo de un proceso amnésico mediante el uso de análogos de cAMP, activadores e inhibidores de PKA^{23, 24} (Figura 4), en paralelo con resultados obtenidos utilizando otros inhibidores de PKA en pollos²⁹.

Figura 4:



Este tipo de evidencias farmacológicas, junto con evidencias genéticas utilizando mutantes de aprendizaje y memoria en *Drosophila*, permitieron poner de manifiesto la relevancia del papel de la PKA en la memoria, que previamente había sido propuesto a partir de modelos in vitro.

¿Cuál es la ventaja de realizar experimentos farmacológicos en *Chasmagnathus*? La ausencia de una barrera hemato-cerebral endotelial en estos animales permite la administración sistémica de drogas mediante un tratamiento no traumático, trabajando a muy bajas dosis, equivalentes o aún menores a las utilizadas in vitro.

Mediante esta metodología hemos detectado dos períodos críticos de actividad de la PKA durante la consolidación de la memoria, durante los cuales la administración de un inhibidor específico de PKA resulta amnésica. La actividad de PKA se requiere durante el entrenamiento y en un período posterior, entre las 4 y las 8 horas post-entrenamiento¹³ (Figura 5).

Figura 5

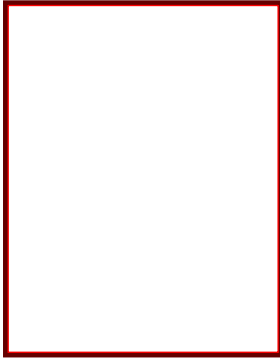


Figura 5: Dos períodos sensibles a la inhibición de PKA durante la consolidación de MCS. Los gráficos muestran la respuesta de escape en la sesión de evaluación de la memoria, 24 hs después del entrenamiento, después de la inyección de solución salina (a) o inhibidor de PKA (b) a distintos tiempos respecto del entrenamiento. La barra gris vertical indica el período de entrenamiento. CTX: animales no entrenados que permanecieron en el contexto durante la sesión de entrenamiento; ENT: animales entrenados con 15 ensayos espaciados. Los datos se muestran normalizados a la respuesta de los animales CTX. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ comparaciones planeadas CTX vs ENT.

Este curso temporal es similar al encontrado para otra quinasa, IKK, que será discutida en la siguiente sección. En coincidencia con estos estudios, PKA está activa en el cerebro de *Chasmagnathus* inmediatamente después del entrenamiento y a 6 horas después¹⁴.

¿Cómo se explica que una vía de señalización que participa en muchos procesos metabólicos tenga un papel tan específico en la memoria, para la que se requiere acción en un limitado juego de sustratos en sitios restringidos? La PKA presenta básicamente dos isoformas, tanto en vertebrados como en invertebrados, PKAI y PKAII, con diferente distribución subcelular, y asociada con distintas proteínas de anclaje. La activación diferencial de estas isoformas conferiría tal especificidad. La participación diferencial de isoformas de PKA en memoria es materia de debate. En este contexto, hemos obtenido evidencias que sugieren un novedoso mecanismo para lograr un aumento prolongado de PKA durante la consolidación, el aumento en los niveles de PKAI, la isoforma más a fin al cAMP (casi 10 veces más afin que PKAII). Esto permitiría activar PKA a niveles muy bajos de cAMP, aún a niveles basales¹⁴.



Un novedoso mecanismo de señalización sinapsis-núcleo: Nuclear Factor - kappa B (NF-kB), su inhibidor, IκB, e IκB quinasa (IKK).

Un paso relevante de las investigaciones en *Chasmagnathus* ha sido el hallazgo de la participación

del sistema IKK / NF- κ B por primera vez en un proceso de memoria y, a su vez, la obtención de las primeras evidencias sobre la activación en las terminales sinápticas, apoyando la hipótesis sobre un novedoso mecanismo de señalización sinápsis-núcleo. Rel/NF- κ B es una familia de factores de transcripción muy conservada en la evolución, tanto en sus componentes como en su función. Está involucrada en la respuesta inmune y en apoptosis. Está presente en el sistema nervioso central y existen evidencias sobre su papel en plasticidad neuronal. Distintas señales que llevan a la activación de la proteína quinasa IKK (IkappaB quinasa) lo activan, ya que IKK fosforila al inhibidor de NF- κ B, I κ B. Esta fosforilación permite la degradación de I κ B y la consecuente traslocación de NF- κ B al núcleo.

En *Chasmagnathus*, un entrenamiento espaciado, que induce MCS, aumenta la actividad de NF- κ B medida a partir de extractos nucleares del cerebro. Por otro lado, hemos determinado dos fases de activación de este factor, de manera similar a la descrita en otros sistemas, donde el mismo es activado. Asimismo, existe una fuerte correlación entre las condiciones de entrenamiento necesarias para la formación de la MCS y aquellas para activar NF- κ B, en cuanto a cantidad de ensayos y frecuencia de estimulación ^{7,8} (Figuras 6a, 6b, 6c).

Figura 6a

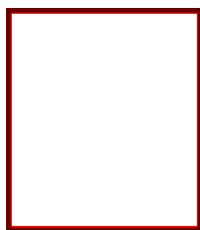


Figura 6a: El entrenamiento espaciado (STr) y no el masivo (MTr) inducen activación en el núcleo de NF- κ B inmediatamente luego del entrenamiento. La unión a DNA de B fue determinada por EMSA. Se graficó la relación de medidas densitométricas de las bandas de retardo específicas de grupos entrenados (STr y MTr) y controles (CS). Estos últimos fueron entrenados simultáneamente con los otros grupos. CS: entrenamiento continuo (600 E, IEE=0 s). MTr: entrenamiento masivo (300 E, IEE=4 s). STr: entrenamiento espaciado (30 E, IEE=100 s).

Figura 6b



Figura 6b: 15 o más ensayos, y no 10 o menos, inducen tanto activación nuclear de NF- κ B como MCS. Izquierda: Niveles de activación de NF- κ B determinados por EMSA. Los valores se obtuvieron igual que en la figura 6a. Los grupos fueron entrenados con 5, 10, 15 o 30 ensayos espaciados, en simultáneo con los grupos controles (CS). Derecha: Grupos entrenados con 5, 10, 15

o 30 ensayos espaciados. La sesión de evaluación tuvo lugar 24 hs luego del entrenamiento, y consistió de un ensayo de presentación del estímulo. Los grupos control fueron colocados en los actómetros, pero no recibieron entrenamiento y fueron testeados igual que los grupos entrenados. Barras blancas: grupos control. Barras llenas: grupos entrenados. * y barras negras: diferentes significativas con los respectivos grupos control en comparaciones planeadas ($\alpha=0.01$, $F=7.2$ y 9.4 , respectivamente).

Figura 6c



Figura 6c: Curva temporal de activación de NF- B luego de un entrenamiento espaciado. Cada barra corresponde a la media de triplicados de experimentos independientes. Cada grupo de animales fue sacrificado a los tiempos indicados luego de un entrenamiento espaciado (30 E) o continuo (600 E). La actividad de unión al DNA fue determinada por ensayos de EMSA.

También se ha encontrado activación de NF-kB en extractos sinaptosomales (terminales sinápticas aisladas), inducida por el entrenamiento, constituyendo la primera evidencia in vivo del mecanismo propuesto mediante el cual la transmisión sináptica activa localmente a NF-kB, que luego viaja por transporte retrógrado, a través de las prolongaciones neuronales, hasta el núcleo. También se ha determinado que un inhibidor de IKK (y por lo tanto de NF-kB) es amnésico y, a su vez, capaz de inhibir la actividad endógena de IKK y de NF-kB en el cerebro central de *Chasmagnathus*¹⁸. El efecto amnésico de la droga tiene lugar de manera coincidente con las dos fases de activación de NF-kappaB previamente observadas (Figura 7), sustentando la idea de que la activación de dicho factor de transcripción es necesaria para la consolidación de la MCS.

Figura 7

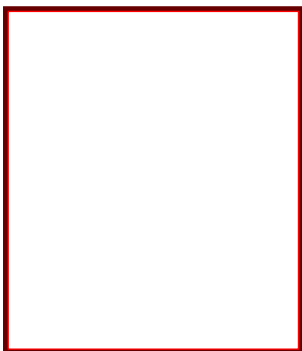


Figura 7: Comparación entre el curso temporal de activación de NF-kB inducida por el entrenamiento y la amnesia inducida por sulfasalazina. A. Actividad de NF-kB durante y a diferentes tiempos después del entrenamiento determinado por EMSA. Línea punteada: Actividad de unión al DNA en grupos control. B. Efecto de sulfasalazina sobre la MCS. La abscisa representa el tiempo de inyección con respecto a la finalización del entrenamiento. Los valores fueron normalizados a los respectivos grupos controles. Círculos abiertos: Media \pm SD de CT-SSZ. Barras grises: Media \pm SD de TR-SSZ. Rectángulo rayado: sesión de entrenamiento. *: $p<0.05$. **: $p<0.01$.



Proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Las MAPKs son proteínas quinasas clásicamente activadas por receptores tirosina quinasas tales como los receptores de factores neurotróficos. En esta familia de quinasas se encuentran, entre otras, ERK1 y ERK2 (por “extracellular signal-regulated kinase” quinasas reguladas por señales extracelulares), p38 (llamada de esta forma debido a su peso molecular) y JNK (kinasa de la región aminoterminal del factor de transcripción c-jun). Las MAPKs son muy estudiadas por su papel en la división celular y apoptosis. Sin embargo, a partir de trabajos realizados en *Aplysia* y en la potenciación de largo término (LTP) en hipocampo de roedores, se ha observado que ERK1/2 cumplen un papel importante en plasticidad neuronal^{17,26}. Posteriormente se han visto involucradas en procesos de memoria en roedores^{1,3,26}. A pesar de que es una vía muy conservada, no hay todavía trabajos que muestren su participación en procesos amnésicos en modelos de invertebrados.

En *Chasmagnathus* hemos determinado, mediante anticuerpos, la presencia de una quinasa homóloga de ERK y otras dos quinasas homólogas a JNK1 y 2 en el cerebro. JNK1 y 2 de *Chasmagnathus* muestran una activación poco específica, ya que se observa también en controles de estrés, estimulación visual y motora. Por el contrario, si bien ERK muestra una activación en los controles, el entrenamiento espaciado provoca una clara activación con una cinética distinta a la de éstos (Figura 8), mostrando una activación significativa a una hora del entrenamiento. A su vez, un inhibidor de esta vía, PD 098059, resulta amnésico únicamente cuando es administrado poco antes del pico de ERK, indicando que esta activación es necesaria para la consolidación de la memoria⁵.

Figura 8

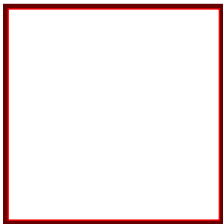


Figura 8: Comparación entre el curso temporal de activación de ERK/MAPK inducida por el entrenamiento espaciado y los controles. Arriba: Activación de ERK/MAPK inducida por el entrenamiento espaciado en comparación con animales Naïve. Abajo: Activación de ERK/MAPK inducida por el entrenamiento continuo (CT Activo) y exposición al contexto (CT Pasivo) en comparación con animales Naïve. En ambos casos se representan las medias \pm SD de 4 experimentos independientes de Western Blot con anticuerpos contra la forma fosforilada de ERK1/2. *: $p < 0,05$ en comparaciones planeadas.

Clásicamente, se atribuye a ERK una función nuclear, fosforilando factores de transcripción, marco en el cual se interpreta su rol en memoria. Sin embargo, en nuestro modelo hemos encontrado únicamente una activación de ERK en la fracción citosólica, mientras que en la fracción nuclear no se observan variaciones. Este resultado indicaría la posibilidad de que ERK posea también sustratos citoplasmáticos, que deben ser fosforilados como parte del mecanismo de consolidación, lo cual presenta una pregunta interesante para el rol de esta vía de transcripción en el sistema nervioso. ¿Cuáles son esos sustratos citoplasmáticos? ¿Qué papel cumplen con la reestructuración de los contactos sinápticos y, en general, en la consolidación de la memoria?

Las vías de señalización intracelular son complejas y, en muchos casos, se encuentran interrelacionadas entre sí. Existe la tendencia a interpretar estudios realizados sobre una proteína quinasa o un único factor de transcripción como los responsables del complejo proceso de la formación de la memoria. Consideramos que este enfoque es incorrecto y que es necesario el estudio de distintos mecanismos moleculares y su inter-relación para llegar a una mejor comprensión del fenómeno. Es en este contexto que estudiamos distintas vías de señalización y su posible interacción. El avance en esta área de investigación se enriquece mediante el uso de distintos modelos, tanto en vertebrados como en invertebrados, que permiten poner en relevancia distintos aspectos de este fenómeno tan complejo.

Bibliografía

1. Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y. (1998) Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *The Journal of Neuroscience*, 18 (23): 10037-10044.
2. Berón de Astrada M and Maldonado H. Two related forms of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by scopolamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 63(1): 109-118, 1999.

3. Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, Medina JH. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Research Molecular Brain Research*, 76 (1): 36-46, 2000.
4. Delorenzi A, Dimant B, Frenkel L, Nahamod VE, Nässel DR and Maldonado H. High environmental salinity induces memory enhancement and increases levels of brain angiotensin-like peptides in the crab, *Chasmagnathus granulatus*". *The Journal of Experimental Biology*, 203(22): 3369-3379, 2000.
5. Feld M, Dimant B, Delorenzi A, Coso OA and Romano A. Non-nuclear activation of ERK/MAPK during long-term memory consolidation in *Chasmagnathus*. *Manuscrito en preparación*.
7. Freudenthal R, Locatelli F, Hermitte G, Maldonado H, Delorenzi A, Lafourcade C and Romano A. Kappa-B like DNA-binding activity is enhanced after a spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience Letters* 242: 143-146, 1998.
8. Freudenthal R and Romano A. Participation of NF-kB transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Research* 855: 274-281, 2000.
9. Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER. The long and the short of long-term memory-a molecular framework. *Nature* 322:419-422, 1986.
10. Hermitte G, Pedreira ME, Tomsic D and Maldonado H. Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long term habituation after spaced, but not massed, training in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of Learning and Memory* 71: 34-49, 1999.
11. Kandel ER. *The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses*. *Science*, 294:1030-1038, 2001.
12. Kornhauser JM, Greenberg ME. A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. *Neuron*, 18: 839-842, 1997.
13. Locatelli F, Maldonado H and Romano A. Two critical periods for cAMP-dependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of Learning and Memory* 77(2): 234-249, 2002.

14. Locatelli F and Romano A. Differential role of cAMP-dependent protein kinase isoforms during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. Enviado para su publicación a *Learning and Memory*.
15. Lozada M, Romano A and Maldonado H. Long-term habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiology and Behavior* 47: 35-41, 1990.
16. Maldonado H, Romano A and Tomsic D. Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30: 813-826, 1997.
17. Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel E. MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron*, 18: 899-912, 1997.
18. Merlo E, Freudenthal R and Romano A. The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience*, 112(1):161-172, 2002.
19. Pedreira ME, Dimant B, Tomsic D, Quesada-Allué LA and Maldonado H. Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 52:124-127, 1995.
20. Pedreira ME, Dimant B and Maldonado H. Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54: 611-617, 1996.
21. Pedreira ME, Perez-Cuesta LM, Maldonado H. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *The Journal of Neuroscience*, 22(18): 8305-11, 2002.
22. Pedreira ME and Maldonado H. Protein synthesis subserves memory reconsolidation or extinction depending on the re-exposure duration to the learning context. *Neuron*, 38(6):863-9, 2003.
23. Romano A, Delorenzi A, Pedreira ME, Tomsic D and Maldonado H. Acute administration of a cAMP analog and a phosphodiesterase inhibitor improve long-term habituation of the crab *Chasmagnathus*. *Behavioral Brain Research*, 75:119-125, 1996.
24. Romano A, Locatelli F, Pedreira ME, Delorenzi A and Maldonado H. Effect of activation and inhibition of cAMP-dependent Proteinkinase on long-term habituation of the crab *Chasmagnathus*.

Brain Research, 735:131-140, 1996.

25. Schafe, GE; Atkins, CM; Swank, MW; Bauer, EP; Sweatt, JD and LeDoux, JE. Activation of ERK/ MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of Pavlovian Fear Conditioning. The Journal of Neuroscience, 20(21):8177-8187, 2000.

26. Sweatt, JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. Journal of Neurochemistry, 76 (1): 1-10, 2001.

27. Tomsic D, Pedreira ME, Hermitte G, Romano A and Maldonado H. Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab Chasmagnathus. Animal Learning and Behavior, 26 (2): 196-209, 1998.

28. Tomsic D, Berón de Astrada M, Sztarker J. Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an arthropod. The Journal of Neuroscience, in press.

29. Troncoso J and Maldonado H. Two related forms of memory in the crab Chasmagnathus are differentially affected by NMDA receptor antagonists. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 72(1-2): 251-265, 2002.

30. Zhao WQ, Polya GM, Wang BH, Gibbs ME, Sedman GL, Ng KT. Inhibitors of cAMP-dependent protein kinase impair long-term memory formation in one day-old chicks. Neurobiology of Learning and Memory, 64(2): 106-18, 1995.

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Vol. 2, número 2, 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

F