

Entrevista con la Dra. Regina Wigdorovitz de Wikinski

Regina Wigdorovitz de Wikinski, Profesora Titular Emérita de la UBA es la actual Decana de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Casada, madre de dos hijas profesionales y abuela, recibió a QV en su cálido despacho del Decanato donde se desarrolló la entrevista.

—¿Dónde realizó sus estudios secundarios y universitarios? ¿Cómo se despertó su vocación por la Bioquímica?

—Yo cursé la escuela secundaria en el Liceo N° 2, de la Capital Federal. Como era buena alumna, no podía saber si me gustaba mucho más una materia que otra. Sin embargo, mientras cursaba se despertó mi vocación por la Bioquímica. En esa época había que ser Farmacéutico para ser Bioquímico, así que estudié primero Farmacia y después Bioquímica. Antes de ingresar a la Facultad se me presentó la alternativa de estudiar Química o Bioquímica pero, posiblemente debido a la influencia de mi familia, que pensaba que era bueno tener una profesión liberal, me recibí de Farmacéutica. Hay que ubicarse también en el año 1947, todavía no había un sistema científico desarrollado. Sin embargo, yo tenía una prima que estudiaba la Licenciatura en Química y otra que era investigadora en Biofísica en Rosario, siendo Bioquímica.

—¿Ud. empezó los estudios en el 48, en esta Facultad?

—Sí, pero la Facultad todavía dependía de la Facultad de Ciencias Médicas. Volviendo a mi vocación, la elección entre la Biología y la Química, muchas veces dependía, en gran medida, de los profesores que nos enseñaban. Su influencia ha sido y es fundamental. Por eso es tan importante que la enseñanza media mejore, porque no solamente se necesita que los alumnos aprendan sino que tengan una orientación desde jóvenes.

Junto con profesores de Odontología y Fonoaudiología y la Secretaría Académica de la Universidad hicimos un trabajo para conocer cómo se despertaban las vocaciones. Fue un proyecto muy bien pensado porque tuvimos referentes claves y además, realizamos entrevistas prolongadas, conocimos historias de vida. Si puedo decir algo esencial como resultado de dicho trabajo es que las vocaciones se despiertan en la escuela secundaria, durante los últimos años, e influyen muchísimo los profesores, sus personalidades, su entusiasmo y su pasión. En muchos

casos en la carrera de Bioquímica se encuentra gente que no sabe bien si le gusta Medicina o Bioquímica.

—**¿Cómo compatibilizó su carrera con la vida de familia?**

—Yo he tenido una familia muy contenedora. Nos conocimos con mi esposo siendo estudiantes. Nuestra relación se basó en el respeto mutuo, estudiábamos juntos y luego trabajamos juntos, aunque al principio investigábamos en los mismos temas y formamos un grupo de investigación.

—**¿Él siempre se dedicó a la investigación?**

—No, él es Anestesiólogo e hizo su carrera primero como Médico Clínico y después hizo un postgrado en Anestesiología. Hizo su tesis de doctorado después que yo me había recibido de Bioquímica. Los dos estábamos en condiciones de estudiar el mecanismo de acción de agentes anestésicos. Fundamentalmente de anestésicos locales, así que todos mis primeros trabajos, fueron el estudio de mecanismos de acción de anestésicos locales y formamos un equipo con otro amigo nuestro que después se fue a Estados Unidos y fue Profesor Titular allá. No es mi tema actual, pero en esa época era la forma de iniciarnos en la investigación, a la que nos dedicábamos con toda nuestra pasión e interés. Por eso pudimos publicar en el exterior. Mientras estudiaba Bioquímica, trabajaba en una Farmacia, después tuvimos una Farmacia con mi papá, pero cuando me recibí de Bioquímica la cerramos.

Retomando la importancia del núcleo familiar, mi papá y mi mamá nos ayudaron con las nenas y además había posibilidad de tener una persona de ayuda en la casa.

—**¿Entonces fue un trabajo familiar?**

— Tanto que cuando sacamos un premio de la Academia Nacional de Medicina, nuestra hija mayor nos mandó un ramo de flores con una tarjetita que decía: “La procaína, Mariana y yo crecimos juntas”. Yo creo que de todas maneras, las mujeres tienen un período que yo no llamaría de atraso, porque después desde el punto de vista personal es muy rico, pero en la carrera de las mujeres habría que considerar que debe haber unos cinco años que no son tan productivos y depende de la cantidad de hijos que uno tenga.

¾ ¿Estuvo trabajando en Venezuela?

— Sí, desde 1977 al año 85. Trabajé en la Universidad Central de Venezuela en la Facultad de Medicina en la Cátedra de Fisiopatología que está situada en el Instituto de Medicina Experimental. Es uno de los mayores lugares de investigación en Venezuela junto con el IVIC.

—Mejor sería que procedamos en orden, usted comenzó a trabajar como Ayudante de primera, luego...

—Efectivamente, cuando me recibí comencé a trabajar como Ayudante de primera en la Cátedra de Análisis Clínicos. Fui a la Cátedra para poder hacer un trabajo de investigación sobre el metabolismo de anestésicos porque el Profesor, que era un discípulo de Marenzi, tenía buenos antecedentes en investigación. Cuando lo conocí, le conté cuáles eran los problemas del mecanismo de acción de los anestésicos tomando como modelo la procaína y como él había trabajado en una molécula similar, las sulfamidas, se interesó en la propuesta.

¾ ¿Entonces ahí ya estaba trabajando con la procaína?

—Sí, tuve una beca de la UBA para ese trabajo en 1961. En relación con la investigación, al terminar la carrera comencé a pensar en términos bioquímicos, acerca de los mecanismos de acción de anestésicos locales. En esa época, en la Argentina se usaba muchísimo la procaína, no como anestésico local sino como anestésico general. Esta práctica había surgido porque durante la segunda guerra mundial no llegaban gases anestésicos a nuestro país. De modo que se había desarrollado una forma de anestesiar que era la procaína por inyección intravenosa, por eso si nosotros no hubiéramos averiguado el mecanismo no lo habría hecho nadie.

—¿Cómo fue ese período inicial?

—Hasta el año 67 seguí trabajando con la procaína, lidocaína y otros relajantes musculares. Yo inventé el método de determinación de procaína, en presencia de ácido de para-amino-benzoico, que es su metabolito y lo utilizamos muchísimo. En 1967 comencé a trabajar en lípidos y arteriosclerosis.

¾ ¿Cómo eran los sueldos?

—Mis ingresos como Ayudante nunca fueron demasiado significativos, pero mi marido era médico y como tal teníamos un buen pasar. Al principio, cuando era Farmacéutica, yo ganaba más que mi marido, pero después dejé la Farmacia y empecé a trabajar como Ayudante. Mi esposo era el

Anestesiista de Ricardo Finochietto, trabajaba en el Hospital Rawson y el ingreso de la familia era excelente.

Luego fui Jefe de Trabajos Prácticos y en el año 1972 Profesora Adjunta por concurso.

—**¿Cuándo volvió de Venezuela qué cargo tenía acá?**

—Primero fui Profesora Asociada, ni bien llegué, y en cuanto se abrió el concurso me presenté a Titular. Eran concursos donde el nivel no estaba previsto, lo daba el jurado.

Acá en la Facultad estaba el Dr. Lugones como Decano y él consideraba que era mejor esa forma.

^{3/4}**¿Cuál es el nombre de la Cátedra?**

—Análisis Clínicos I, que comprende varias especialidades entre las cuales hay un área de Química Clínica, yo concursé en esa área. Cuando me jubilé era titular de la Cátedra, yo era la única Profesora Titular en ese momento y también fui Directora del Departamento a partir del año 1986.

—**¿Cuánto tiempo permaneció en el cargo de jefe de Departamento?**

—Un total de nueve años porque primero me había elegido el Consejo Directivo, después establecimos un sistema de elección por pares, así que me eligieron una vez y me reeligieron la única vez que me podían reelegir, cada período duraba tres años. Ser Directora del departamento fue un trabajo sumamente comprometido porque había que llevar adelante las relaciones con el Hospital de Clínicas. Si tuviera que destacar algo de la tarea realizada fue el reforzar la integración del Departamento de Bioquímica Clínica con la Facultad. Cuando volví, el Departamento de Análisis Clínicos que está en el Hospital de Clínicas, estaba formado por dos Cátedras, ahora son tres. El Departamento está a cargo del Laboratorio del Hospital, desde fines de la década del 60. A fines de esa década yo fui parte del movimiento de traslado, y luchamos para eso. Una vez que nuestras cátedras se trasladaron al Hospital de Clínicas y se hicieron cargo del Laboratorio, hubo una segunda etapa, una etapa muy importante porque cada Cátedra de Medicina del Hospital, tenía un laboratorio, los laboratorios eran chiquitos, eran pobres, tenían poca gente y pocos aparatos. En esa época cuando Guillermo Jaim Etcheverry fue Decano, se trató de hacer una modificación importante. Él me pidió que me hiciera cargo de una Comisión para evaluar la situación de los Servicios Centrales entre los cuales estaban el Laboratorio y Anatomía Patológica. Trabajé mucho como Presidente de la Comisión. Una de los trabajos que hicimos fue desarmar los laboratorios periféricos y hacer un gran laboratorio central muy bien equipado, porque ya veníamos equipados por el BID, cuando el Hospital de Clínicas se puso en funcionamiento.

¾ ¿Es un laboratorio grande?

—Sí. Tiene quince secciones, allí también se hace docencia e investigación. En la actualidad hay catorce profesores. La Química Clínica es una de las grandes especialidades troncales dentro de la Bioquímica, por eso desde el principio yo vine haciendo trabajo de investigación, de docencia y de asistencia. En mi sector, se pensó siempre en un continuo, entre la investigación básica, la aplicada y la aplicación a la clínica. Antes de la reforma, los laboratorios periféricos estaban todos dispersos y dependían del Profesor Titular de Medicina. Los Bioquímicos estaban siempre en función secundaria y lo que nosotros hicimos fue absorber a los Bioquímicos. A nosotros nos preguntaron si los queríamos, y dijimos que sí, pero no a todos, porque sabíamos que había algunos que eran muy útiles para investigaciones puntuales.

—¿Toda la gente que trabaja en este laboratorio es dependiente de Farmacia y Bioquímica?

—No, en parte depende del Hospital, son cargos del Hospital, y en parte depende de la Facultad, en realidad desde el punto de vista funcional en su trabajo, depende de la Facultad, pero hay reglas asistenciales que todos deben respetar en el Hospital.

¾ ¿Qué opina del trabajo intergrupos?

—Si uno como Director hace bien el trabajo, la gente se independiza, pero yo creo que los grupos de investigación tienen que seguir unidos, que la gente que tiene temas semejantes y proyectos en común tiene que reunirse y se debe trabajar en conjunto porque la riqueza de la interacción es algo que no se debe perder. El Departamento de Bioquímica Clínica, por su propia naturaleza, tiene nueve grupos de investigación y por lo tanto hay trabajos que son intergrupos. En general yo creo que la gente primero trata de desarrollarse en una dimensión, en un área y cuando se siente bastante madura, entonces empieza a interactuar, no sé si eso es bueno, habría que pensarlo.

—¿Qué ideas influyeron para que comenzara a participar en la política Universitaria?

—La razón que me ayudó a decidirme fue precisamente que yo venía de un Departamento al que encontré, a mi vuelta de Venezuela, un poco alejado de la Facultad y cuando me nombraron Consejera, me di cuenta que el trabajo que se debía hacer era integrarlo a la Facultad. Antes de mi vuelta, yo había recibido un pedido de parte del Dr. Paladini para que propusiera una reforma departamental. Me puse a trabajar en el proyecto en Venezuela, y estaba en contacto con mis colegas continuamente.

¾ ¿Cómo fue su carrera hacia el Decanato?

—Como dije antes fui Consejera del 90-94 y luego Vicedecana desde 1992 hasta 1994 porque falleció la Vicedecana en ejercicio, entonces me eligieron para ocupar ese cargo vacante. Luego me reeligieron en 1994-1998.

¾ ¿Cómo resulta ser Decana?

—Es una posición muy compleja porque el Decano no es un funcionario público, es un funcionario electo por un periodo determinado que tiene muchas responsabilidades y menos poderes de lo que la gente cree.

¾ Ahora pasemos a otra fase, ¿actualmente está investigando?

—Sí, absolutamente. Desde que empecé con las lipoproteínas seguí trabajando permanentemente.

¾ ¿Cuántas tesis ha dirigido?

—Desde que volví dirigí cinco tesis, pero en Venezuela dirigí dos tesis de Maestría que en esa época eran muy importantes y cuatro trabajos de ascenso de Profesores que equivalen a Tesis. Además dirigí dos Tesinas de la Facultad de Ciencias Exactas de dos alumnos que se recibieron de Licenciados en Biología en Venezuela.

¾ ¿Entonces, cuándo salió su jubilación?

—En el año 96, a continuación, me nombraron Profesora Emérita. Sigo trabajando en el mismo laboratorio y en el mismo tema que evolucionó muchísimo, lipoproteínas y arteriosclerosis. Para ser más certera diría que en realidad se van agregando temas porque hay factores emergentes que ya no son lipídicos que se van incorporando.

¾ ¿Ud. tiene becarios que está dirigiendo?

—Yo hice un proceso que me parece que es correcto que fue formar un laboratorio y desde que soy Decana, la Profesora Adjunta con Dedicación Exclusiva, de acuerdo conmigo, comparte la dirección de las tesis. Pero no es que ella sea Codirectora y yo Directora, sino que ella dirige unas tesis y yo otras, y yo voy transfiriendo permanentemente esa filosofía de no acaparar. De manera que ahora la Profesora Adjunta está dirigiendo tres tesis de ex- becarios míos.

$\frac{3}{4}$ ¿En qué piensa continuar al terminar su mandato?

—Pienso trabajar, siempre y cuando, tenga capacidad de producción.

The logo for 'Química Viva' features the text 'Química Viva' in white on a blue rectangular background. To the left of the text is a small white icon consisting of a vertical bar and a downward-pointing triangle.

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**
Número 3, año 3, septiembre 2004
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Tuberculosis: un viejo enemigo

Hector Ricardo Morbidoni*

Cátedra de Microbiología- Facultad de Ciencias Médicas- Universidad Nacional de Rosario (UNR)-
Santa Fe 3100 (2000) Rosario

Recibido 11 de agosto de 2004
Aceptado 25 de agosto de 2004

Resumen

Mycobacterium tuberculosis, agente causal de la tuberculosis humana, es responsable de casi tres millones de muertes por año en el mundo, siendo además uno de los patógenos oportunistas de mayor incidencia en pacientes HIV+. El tratamiento de la tuberculosis requiere varios antibióticos durante por lo menos seis meses, lo cual causa un elevado grado de incumplimiento. Esta situación favorece la aparición de cepas clínicas resistentes a una o más drogas. Estudios llevados a cabo durante los últimos años han identificado los blancos moleculares de las drogas corrientemente en uso y sus mecanismos de resistencia mas frecuentes. La información generada ha evidenciado un dato de gran interés: la mayoría de las drogas específicas activas contra *M. tuberculosis* (como Isoniacida, Etionamida, o Pirazinamida) afectan la síntesis de ácidos grasos (incluyendo los ácidos micólicos, ácidos grasos de cadena muy larga presentes en micobacterias) o de componentes de la pared celular como el caso arabinogalactano cuya síntesis es inhibida por la droga Etambutol. Estos resultados han generado un gran interés en el estudio de la síntesis de estos componentes celulares para identificar nuevos blancos aptos para el diseño de fármacos, lo cual trae esperanza para lograr mejores drogas para el tratamiento de la tuberculosis.

Palabras claves: tuberculosis, resistencia a drogas, antibióticos, mecanismo de acción, ácidos grasos.

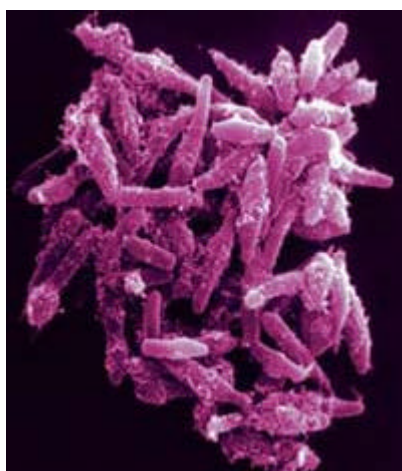
Tuberculosis: an old enemy

Abstract

Mycobacterium tuberculosis, the causative agent of human tuberculosis, is responsible for almost three million deaths annually worldwide, being at the same time one of the prevalent pathogens affecting AIDS patients. The therapeutic treatment of tuberculosis requires the use of several antimycobacterial drugs for a period of six months, leading to a high level of non-compliance. This situation favors the appearance of clinical strains resistant to one or more drugs. Studies performed

over the last few years have identified the molecular targets for the currently used anti-mycobacterial drugs and the most frequent mechanisms of resistance. The information generated have pointed out a very interesting fact: the majority of the specific anti-mycobacterial drugs –such as Isoniazid, Ethionamide or Pyrazinamide- affect the synthesis of fatty acids (including mycolic acids, long-chain fatty acids that are a hallmark of mycobacteria), or the synthesis of components of the cell wall such as arabino-galactan, inhibited by Ethambutol. These results have generated great interest in the study of the biosynthetic pathways of those cell components with the goal of identifying new targets suitable for the design of novel drugs, which brings renewed hope to achieve the goal of obtaining better drugs to treat this dreadful disease.

Key words: tuberculosis, drug resistance, mechanism of action, antibiotics, fatty acids.



La tuberculosis (TB), causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) es una “vieja” enfermedad en términos de su documentación histórica y es todavía un serio problema de salud pública, no solo para países sub-desarrollados, si no también para países industrializados que se consideraban hasta hace poco tiempo a salvo de ella. Las cifras actuales indican que cada año hay alrededor de 50 millones de nuevos casos de TB en el mundo, con aproximadamente tres millones de muertos, lo que lo convierte en el agente infeccioso predominante (1).

Fig. 1: Micrografía electrónica de células de *Mycobacterium tuberculosis* tratadas con la droga anti-tuberculosa Isoniacida (48 h de tratamiento).

La aparición del virus de la Inmuno Deficiencia Humana (HIV) empeoró la situación descrita, debido a que los pacientes con serología positiva para HIV en las categorías A3, B3, C1, C2 y C3 (SIDA) a menudo sufren infecciones diseminadas por MTb o por *M. avium* (una micobacteria patógena oportunista) constituyendo una causa frecuente de muerte. El resurgimiento de la TB en países industrializados a mediados de los años 80 demostró que, lejos de estar terminada, la batalla comenzaba nuevamente y que era necesario estudiar la fisiología de *M. tuberculosis* para comprender sus mecanismos de virulencia e identificar los blancos moleculares susceptibles de ser utilizados en el diseño de nuevas drogas.

Drogas anti-tuberculosas en uso: cuánto sabemos y cuánto falta por saber

Hasta el presente, las drogas empleadas para el tratamiento de la tuberculosis son limitadas, tanto en número y eficacia, como en los blancos moleculares sobre los que actúan. La larga duración

del tratamiento antibacilar y la presencia de efectos colaterales determinan una mayor complejidad en la terapéutica. De hecho, el incumplimiento del tratamiento es una de las causas implicadas en la aparición de cepas multi-resistentes (definidas como resistentes a dos o más fármacos), justificando los esfuerzos en la obtención de nuevas drogas para el tratamiento de esta enfermedad (3). El régimen óptimo de tratamiento de cepas no resistentes de *M. tuberculosis* consiste en un cóctel de tres, cuatro o cinco agentes de primera línea, según la categorización clínica, radiológica y bacteriológica del paciente (2): Isoniacida (INH), Rifampicina (RIF), Pirazinamida (PZA), Etambutol (ETB) y Estreptomina (SM). El tratamiento habitual consiste en una primera fase de dos meses de duración con INH, RIF, PZA y EMB seguida de una segunda fase, de cuatro meses de duración con INH y RIF. Esta combinación de tratamientos es generalmente efectiva aún si el microorganismo es resistente a una de las drogas usadas. Es interesante destacar que a excepción de RIF (un inhibidor de RNA polimerasas procarióticas) y SM (un inhibidor de síntesis de proteínas), los demás quimioterápicos usados actúan sobre la síntesis de ácidos grasos complejos de las micobacterias (4). A continuación se detallarán los mecanismos de acción de los mismos:

Rifampicina (RIF) es un antimicrobiano de amplio espectro, introducido en la terapia anti-tubercular en la década del 70. Se ha demostrado que RIF es capaz de inhibir específicamente el proceso de transcripción mediante la inhibición de la subunidad β de la RNA polimerasa (5). El hallazgo de mutaciones en el gen *rpoB* (que codifica la subunidad mencionada) en cepas de MTb RIF^R confirmó su mecanismo de acción (6).

Estreptomina (SM) es un producto de la bacteria *Streptomyces griseus* (un microorganismo emparentado con las micobacterias) con actividad sobre bacterias Gram (+) y Gram (-). Este antibiótico se une a un sitio en la subunidad 30S del ribosoma impidiendo la iniciación de la síntesis proteica. Uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia a SM consiste en la acilación de la droga por enzimas modificadoras de aminoglucósidos, sin embargo, la resistencia a SM en micobacterias se origina en gran medida en mutaciones en la subunidad 30S, incluyendo mutaciones puntuales en el gen *rpsL* que codifica la proteína ribosomal S12 (7) y en el operón *rrs* que codifica el 16S rARN. La ausencia de mutaciones en estos genes en cepas MTb SM^R indica que posiblemente haya otros mecanismos de resistencia.

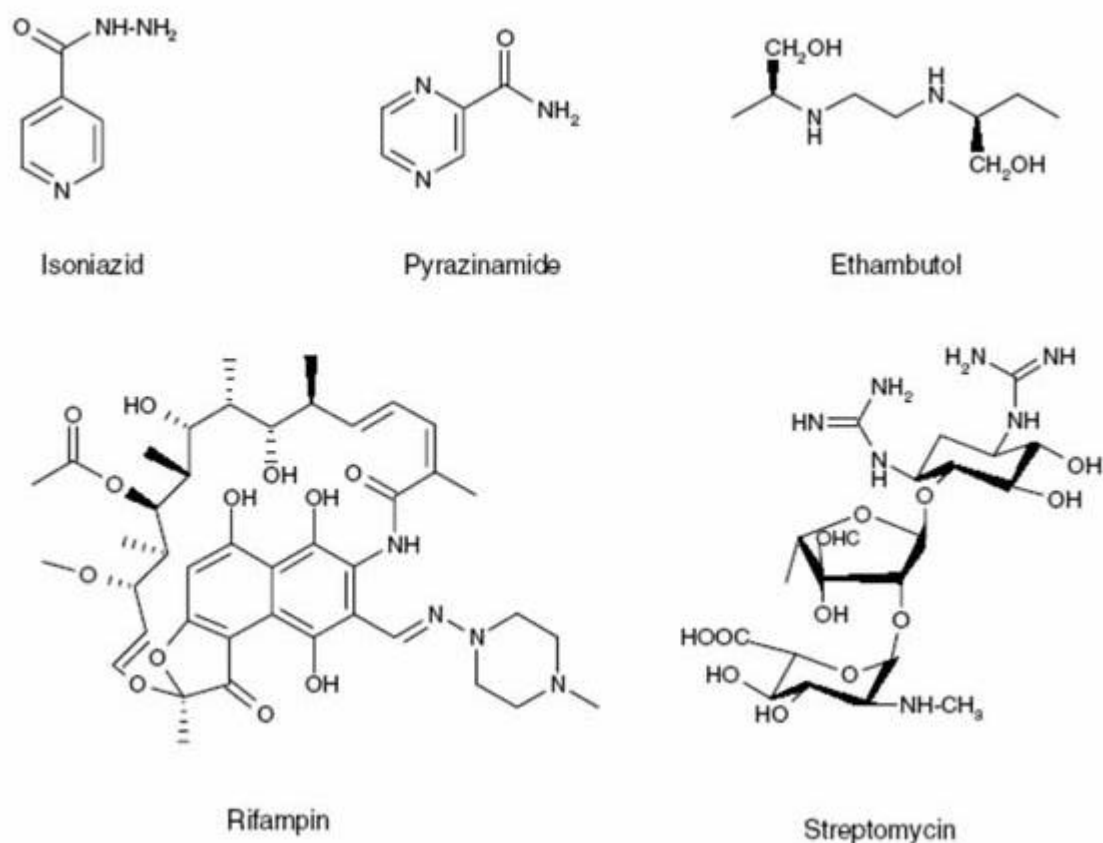


Fig. 2. Estructura de las principales drogas usadas para el tratamiento de la tuberculosis.

Pirazinamida es un derivado de la nicotinamida que se utiliza desde los años 80, generalmente asociada a RIF e INH. A pesar de su buena actividad *“in vivo”* en humanos y modelos animales, PZA muestra poca actividad *“in vitro”* a pH neutro, sin embargo esta actividad se manifiesta si el pH es ácido (5.6) sugiriendo una activación por ácidos (8). Este pH ácido es el existente dentro de los fagosomas de los macrófagos en donde usualmente reside *Mtb*. Interesantemente PZA es activo sobre *MTb* pero no sobre *M. bovis* ni la mayoría de las otras micobacterias, indicando la existencia de un blanco específico en el bacilo de Koch. El derivado de PZA, 5-Cl-PZA es sin embargo de rango más amplio (9). Se determinó que PZA es una pro-droga que requiere ser activada por una “pirazinamidasa” que la convierte en la molécula activa, el ácido pirazinoico (8). La identificación de mutaciones que confieren resistencia a PZA localizadas en el gen *pncA*, que codifican para la mencionada enzima, dieron soporte a esta hipótesis (8). El misterio de la resistencia a PZA en *M. bovis* fue aclarado al secuenciarse *pncA* en este bacilo, encontrándose mutaciones puntuales que eliminaban la actividad, es decir, *M. bovis* es naturalmente resistente a PZA. Aunque *pncA* es la enzima activadora, el blanco molecular se determinó recientemente al hallarse que el tratamiento con PZA inhibía la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (C16-C24). De la misma manera, la super-expresión del gen *fasI* que codifica para la enzima FASI causó resistencia a PZA (10). Sin embargo todavía no se han descrito mutaciones en *fasI* asociadas a PZA^R.

El futuro: Las técnicas de manipulación genética han permitido identificar una serie de blancos moleculares esenciales para la viabilidad y la virulencia de *M. tuberculosis*. A su vez, los progresos realizados con técnicas de química combinatoria brindan la posibilidad de producir bibliotecas de compuestos que posteriormente se prueban sobre *M. tuberculosis* tanto sobre el crecimiento de cultivos como en infecciones de macrófagos. También se determina la actividad “*in vitro*” utilizando ensayos enzimáticos basados en las enzimas identificadas como esenciales (15). Lo anteriormente mencionado, en conjunto con la aplicación de programas inter-disciplinarios involucrados en la búsqueda e identificación de principios anti-tuberculosos de origen natural (presentes en plantas, microorganismos, etc) constituyen al presente, las herramientas más promisorias para la obtención de nuevas drogas que puedan utilizarse en el tratamiento de la tuberculosis.

Referencias:

1. Enarson Da, Chretien J. 1999. Epidemiology of respiratory infectious diseases. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 5(3):128-135.
2. Espinal M.A. *et al*, 2000. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis. *JAMA*, 283(19):2537-2545.
3. Blanchard J, 1996. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann. Rev. Biochem.*, 65:215-239.
4. Chopra I, Brennan P, 1997. Molecular action of anti-mycobacterial agents. *Tuber. Lung Dis.*, 78(2):89-98.
5. Levin ME, Hatfull GF., 1993. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol. Microbiol.*, 8(2):277-285.
6. Telenti A. *et al.*, 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 341(8846):647-650.
7. Finken M. *et al.*, 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.*, 9(6):1239-1246.
8. Scorpio A, Zhang Y, 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/ nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.*, 2(6):662-667.
9. Cynamon MH, Speirs RJ, Welch JT, 1998. In vitro antimycobacterial activity of 5-chloropyrazinamide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(2):462-463.
10. Zimhony O, Cox JS, Welch JT, Vilcheze C, Jacobs WR, Jr., 2000. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* 6(9):1043-1047.
11. Takayama K, Armstrong EL, Kunigi KA, Kilburn JO, 1979. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16(2):240-242.

12. Escuyer VE *et al.*, 2001. The role of the *embA* and *embB* gene products in the biosynthesis of the terminal hexa-arabinofuranosyl motif of *Mycobacterium smegmatis* arabinogalactan. *J. Biol. Chem.*, 276(52):48854-48862.
13. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S, 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 358 (6387):591-593.
14. Vilcheze C, Morbidoni HR, *et al.*, 2000. Inactivation of the *inhA*-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASII end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.*, 182(14):4059-4067.
15. Besra GS, Kremer L., 2002. Re-emergence of tuberculosis: strategies and treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 11(2): 153-157.

*Dr. Hector Ricardo Morbidoni

Investigador Independiente- Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (CIUNR), Cátedra de Microbiología- Facultad de Ciencias Médicas- UNR- Santa Fe 3100 (2000) Rosario

e-mail: morbiatny@yahoo.com

 **Química Viva**
ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**
Número 3, año 3, septiembre 2004
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Ontogenia B: el delicado equilibrio entre la diversidad y la autoinmunidad

Romina Gamberale*

Laboratorio de Inmunología, IIHema, Academia Nacional de Medicina

Recibido 10 de agosto de 2004

Aceptado 29 de agosto de 2004

Resumen

Los linfocitos B, al igual que el resto de las células del sistema inmune, se originan en médula ósea a partir de un precursor común. Las células B comienzan su maduración en la médula ósea y la finalizan en el bazo. Durante las primeras etapas de desarrollo, los esfuerzos se centran en la generación de la inmunoglobulina de superficie que es parte del receptor B (BCR). Una vez que el BCR puede ser expresado en la membrana, los mecanismos de control evalúan la especificidad del mismo, eliminando a aquellos linfocitos B cuyos BCR reconozcan moléculas propias. Si bien durante la ontogenia de linfocitos B la mayoría de las células muere por apoptosis antes de alcanzar la madurez, este proceso, lejos de ser un gasto innecesario de energía, mantiene el delicado equilibrio entre la diversidad y la autoinmunidad.

Palabras clave: linfocitos B, ontogenia

Ontogeny of B lymphocytes: The subtle balance between diversity and autoimmunity"

Abstract

B lymphocytes, as other cells of the immune system, arise from hematopoietic stem cells in the bone marrow. B cells mostly develop in the bone marrow and complete their maturation in the spleen. During the early stages of B cell development control mechanisms are focused on the generation of the surface immunoglobulin, which is part of the BCR. Once the cell can express this receptor the focus shifts to its specificity, eliminating those B lymphocytes with self-reactive BCRs. During B cell development, most of the cells die before become mature. This process, far from being an unnecessary waste of energy, maintains the subtle balance between diversity and autoimmunity.

Key words: B lymphocytes, ontogeny

Introducción

Los seres humanos nos encontramos expuestos continuamente a una gran cantidad de microorganismos potencialmente patógenos, sin embargo, sólo nos enfermamos en forma ocasional. Esto es así gracias a nuestro sistema inmune, el cual constituye un sistema muy eficiente de defensa contra la infección. Distintos tipos de células sanguíneas tales como, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, participan en la respuesta inmunológica. La estrategia de defensa contra la infección involucra distintas etapas: una etapa temprana, conocida con el nombre de inmunidad innata, y una etapa tardía denominada inmunidad adaptativa.

Los linfocitos B y T son los principales protagonistas de la respuesta inmune adaptativa y, a diferencia del resto de las células del sistema inmune, poseen en su membrana receptores antigénicos capaces de reconocer en forma específica pequeñas porciones del patógeno (para el caso de los linfocitos B) o células infectadas con los mismos (en el caso de los linfocitos T). Luego de este reconocimiento, pueden activarse, multiplicarse y diferenciarse en células efectoras capaces de defendernos contra ese microorganismo en particular. La estrategia utilizada en la inmunidad adaptativa para reconocer a la gran cantidad de microorganismos existentes, involucra a una inmensa variedad de linfocitos B y T, cada uno de los cuales porta en su superficie un receptor particular para el antígeno. Gracias a esta gran diversidad de receptores antigénicos, un individuo tiene la capacidad de desarrollar una respuesta inmune adaptativa contra la amplísima variedad de patógenos con los que puede encontrarse durante su vida.

En este artículo, veremos:

- ❖ Las características del receptor antigénico de los linfocitos B.
- ❖ Las etapas de maduración de los linfocitos B durante su desarrollo.
- ❖ Cómo es posible generar la gran diversidad de receptores antigénicos existentes.

¿Cómo es el receptor antigénico de los linfocitos B?

El receptor antigénico de los linfocitos B se denomina BCR (*B cell receptor*) y está constituido por una inmunoglobulina (Ig) asociada con un heterodímero formado por las moléculas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ (**Figura 1**). La Ig que forma parte del BCR no es otra cosa que una molécula de anticuerpo anclada a la membrana. Mientras que esta molécula es la responsable del reconocimiento antigénico, la transducción de la señal al interior de la célula B se lleva a cabo por el heterodímero $Ig\alpha$ - $Ig\beta$.

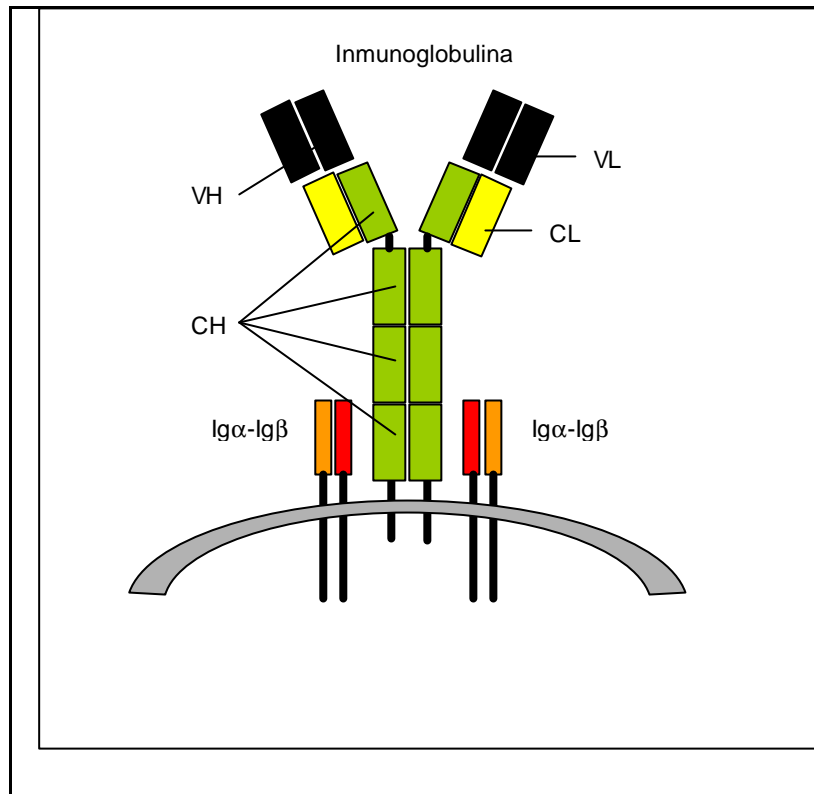


Figura 1: El BCR está constituido por una inmunoglobulina (Ig) de superficie y el heterodímero Ig α -Ig β . La Ig esta constituida por dos cadenas pesadas (H) idénticas entre si, asociadas por puentes disulfuro y dos cadenas livianas (L) idénticas entre si, asociadas a las H por puentes disulfuro. Comparando un gran número de Ig, se observó que la porción amino-terminal de ambas cadenas es variable (V) y está involucrada en el reconocimiento del antígeno. Por el contrario, la porción carboxi-terminal de ambas cadenas es relativamente constante (C). En la figura se observan las cadenas H en color verde, las cadenas L en color amarillo y los dominios variables rayados.

¿Qué función cumplen los linfocitos B?

Aquellos linfocitos B que reconocen al antígeno específico a través del BCR, pueden activarse y proliferar originando un clon de células hijas, para diferenciarse posteriormente a plasmocitos (**Figura 2**). Estos últimos tienen la capacidad de secretar moléculas de Ig (anticuerpos), los cuales poseen la misma especificidad de la Ig que formaba parte inicialmente del BCR. Por lo tanto, los anticuerpos secretados podrán reconocer al microorganismo y reclutar una variedad de mecanismos efectores a fin de destruirlo.

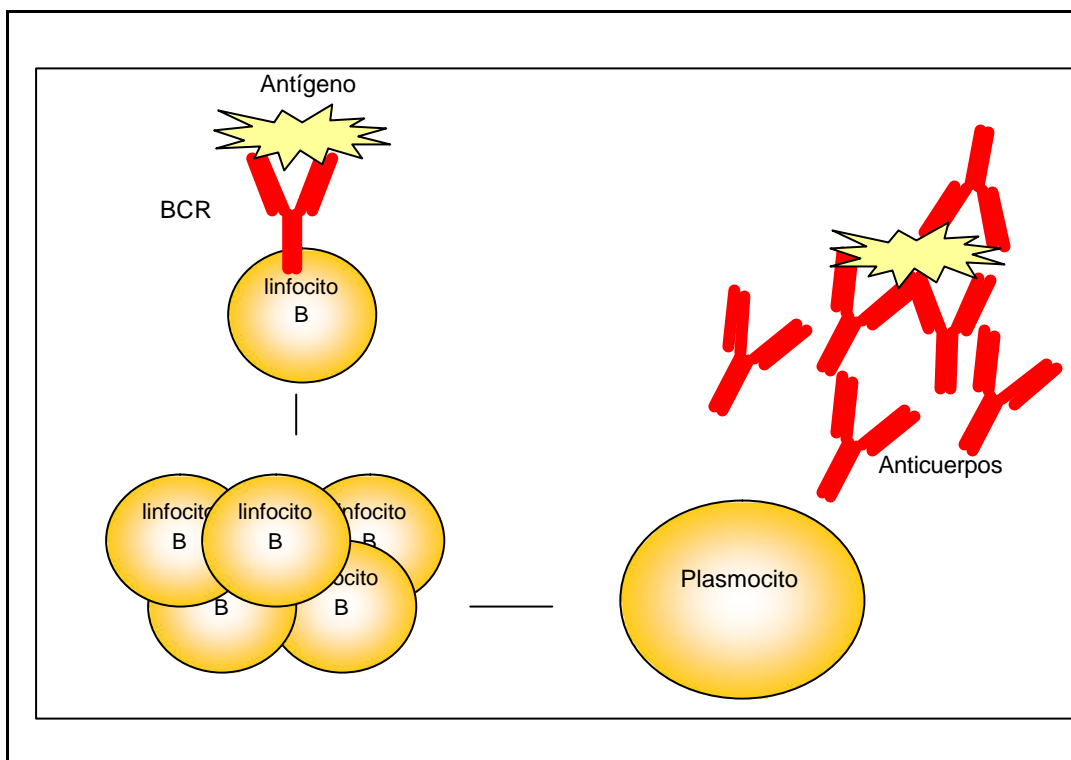


Figura 2

Las distintas porciones constantes de la cadena pesada (CH) dan origen a los diferentes tipos de anticuerpos conocidos (IgM, IgG, IgE, IgA e IgD), y cada una de estas clases de Ig es particularmente eficiente en la activación de los distintos mecanismos efectores. Sin embargo, la Ig que forma parte del BCR no lleva a cabo esas funciones ya que se encuentra anclada en la membrana de la célula B, por lo tanto, solamente es capaz de reconocer al antígeno específico a través de la región variable.

ONTOGENIA de LINFOCITOS B

¿Dónde se originan los linfocitos B?

Los linfocitos B, al igual que el resto de las células del sistema inmune, se originan en la médula ósea a partir de un precursor común, denominado *stem cell* o **célula madre pluripotente hematopoyética** (CMPH) (**Figura 3**). Dichas células tienen la capacidad de autorrenovarse y son, tal como su nombre lo indica, potencialmente capaces de dar lugar a distintos tipos celulares. En el hombre, las CMPH aparecen en el saco vitelino embrionario alrededor de la tercera semana de vida y, a medida que el feto se desarrolla, algunas de estas células migran al hígado. Recién al cuarto mes de vida fetal la médula ósea comienza a ser el sitio donde mayoritariamente ocurrirá la hematopoyesis. Si bien en los adultos la mayor cantidad de CMPH se encuentra en la médula ósea, estas células tienen la capacidad de migrar hacia la circulación, por lo que puede hallarse una pequeña proporción en sangre periférica.

A partir de las CMPH se generan dos tipos de progenitores con potencial pluripotente más acotado que se denominan: **progenitor mieloide**, el cual podrá diferenciarse en células de estirpe mieloide (eritrocitos, plaquetas, monocitos y granulocitos neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y **progenitor linfoide común** (PLC), a partir del cual se generarán los linfocitos B y T. ¿Cómo se decide si el PLC se diferenciará hacia el linaje B ó T? Hasta el momento no está del todo claro este punto, sin embargo, numerosas evidencias sugieren que la señalización a través de una molécula presente en la membrana de los PLC, denominada Notch1, induciría la diferenciación hacia el linaje T, mientras que la ausencia ó inhibición de esa señal favorecería la diferenciación B.

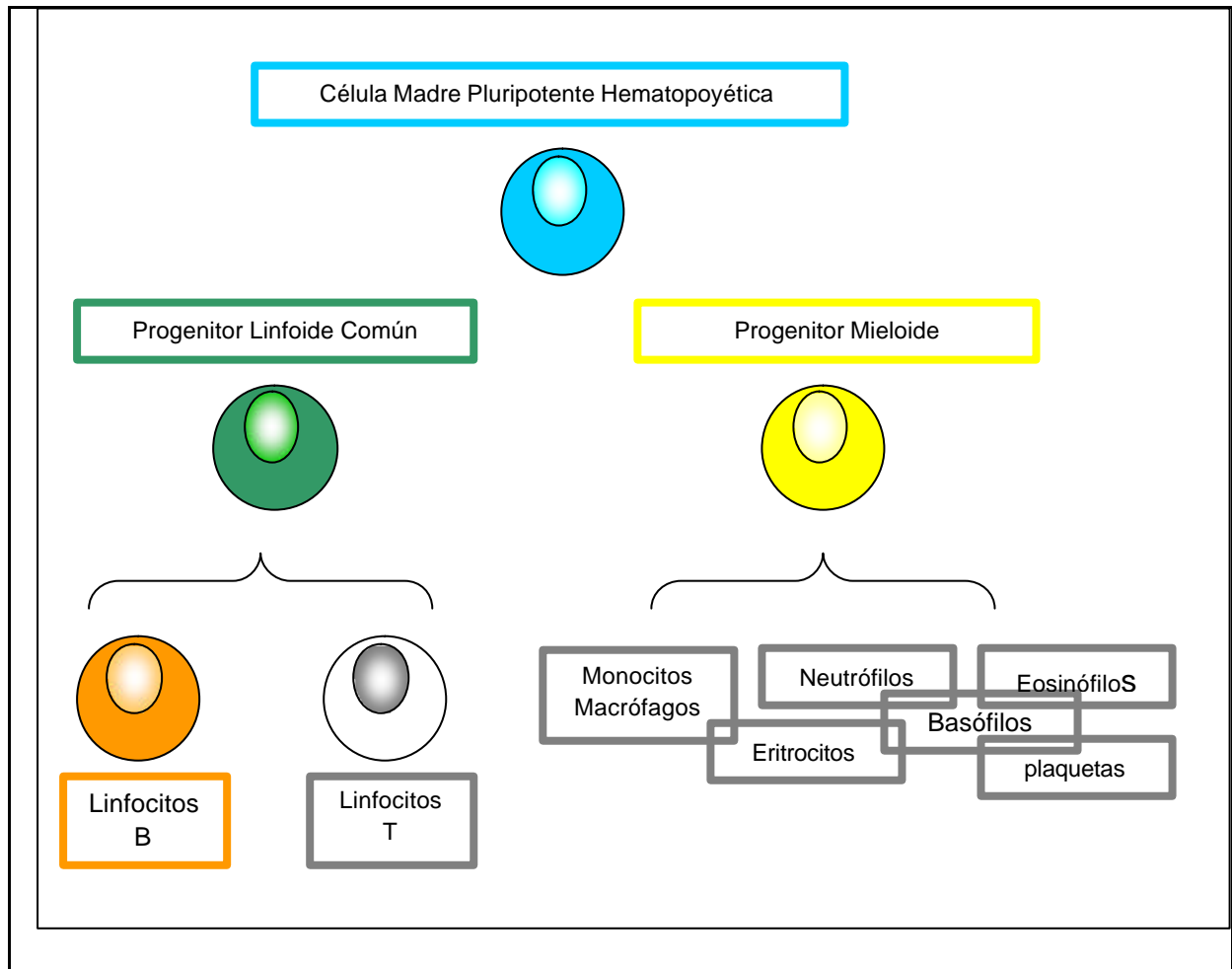


Figura 3

¿Dónde se desarrollan los linfocitos B?

Los linfocitos B se desarrollan mayoritariamente en la médula ósea pero culminan su maduración en el bazo. Su generación se produce en distintas etapas o pasos que deben ir completándose, uno a uno, en forma correcta para poder avanzar en el proceso de maduración. El concepto mismo de maduración linfocitaria implica la generación de un receptor antigénico particular para cada linfocito y su expresión en la membrana antes del ingreso del antígeno. Dado que existen miles de millones de linfocitos B distintos, cada uno de los cuales porta inmunoglobulinas de

superficie con una especificidad única, un individuo posee una gran diversidad de inmunoglobulinas. Tal como veremos a continuación, en las primeras etapas del desarrollo linfocitario, los esfuerzos se centran en la generación de esta Ig y, si esto no es posible, el linfocito no continúa con su desarrollo y se ponen en marcha mecanismos que llevan a la muerte celular programada conocida como **apoptosis** sin alcanzar la madurez.

¿Cómo es posible generar tanta diversidad de inmunoglobulinas?

Las inmunoglobulinas presentan muchísima diversidad. El número total de especificidades de anticuerpos disponibles en un individuo se conoce con el nombre de repertorio de anticuerpos o de inmunoglobulinas y en el ser humano, ese número, es por lo menos de cien mil millones. Antes de que se pudieran analizar directamente los genes que codifican para las Ig, existían dos teorías que intentaban explicar el origen de semejante diversidad. La TEORÍA DE LA LÍNEA GERMINAL postulaba que existía un gen distinto para cada cadena de Ig diferente y, por lo tanto, proponía que el repertorio de Ig era hereditario. Por el contrario, la TEORÍA DE LA DIVERSIFICACION SOMÁTICA postulaba que el amplísimo repertorio se generaba a partir de un conjunto de genes hereditarios que codifican para la porción variable de las las Ig los cuales se modificaban de una manera particular en cada una de las células B. El clonado de los genes de las Ig reveló que, tal como proponía esta última teoría, la generación de diversidad se produce por rearrreglos del ADN que codifica para las porciones variables de las Ig durante el desarrollo de los linfocitos B.

Las cadenas H y L de las Ig están codificadas por distintos grupos de genes y, para cada una de las cadenas, existen varios fragmentos génicos involucrados en la generación de sus porciones variables. En las células que darán lugar a los linfocitos B, estos fragmentos génicos se rearrreglan a través de un proceso que se conoce con el nombre de **recombinación somática (Figura 4)**.

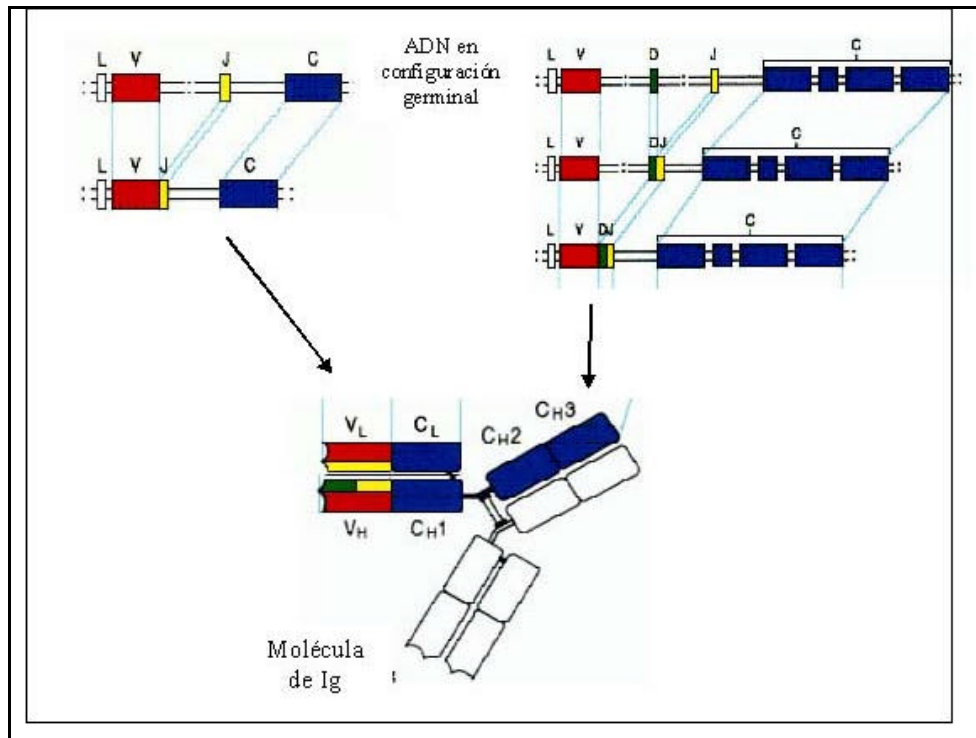


Figura 4: Recombinación somática. La porción variable de la cadena L (V_L) se constituye por combinación de fragmentos denominados V (rojo) y J (amarillo), mientras que la región variable de la cadena H (V_H) involucra, además, fragmentos D (verde). Los fragmentos génicos presentes en el ADN en configuración germinal sufren el proceso de recombinación somática, dando lugar a una combinación única de fragmentos V-J para la porción V_L y V-D-J para la región V_H en cada linfocito B.

Hasta aquí hemos visto de qué manera es posible que se constituya la porción variable de las cadena L y H pero, para simplificar, hemos presentado las cosas como si sólo existiera una copia de cada uno de los genes involucrados en el proceso de recombinación somática. En realidad, en el ADN en configuración germinal, existen múltiples copias de cada uno de los genes involucrados en este proceso y es la selección de un segmento u otro lo que hace posible la gran diversidad de regiones variables entre las distintas Ig. La unión entre los fragmentos recombinados (V_L - J_L ó V_H - D_H - J_H) es imprecisa, lo cual es una fuente extra de variabilidad para la porción variable de las Ig. Los rearrreglos del ADN que generan proteínas no funcionales se denominan "no-productivos" y suelen ser los más frecuentes. Para que un linfocito B pueda desarrollarse normalmente debe lograr un rearrreglo productivo de su Ig, de no ser así, no podrá continuar con su desarrollo y morirá por apoptosis.

Etapas de maduración de los linfocitos B

Tal como hemos mencionado anteriormente, las células B maduran mayoritariamente en la médula ósea. El desarrollo de los linfocitos B depende de la presencia de células estromales que actúan, no sólo como una red de sostén necesaria para que los linfocitos B continúen su desarrollo, sino también como fuente de factores de crecimiento críticos que estimulan la diferenciación y proliferación.

En el primer estadio de diferenciación, conocido con el nombre de estadio **pro-B**, los linfocitos poseen una capacidad limitada de auto-renovación. Durante este estadio es que se produce el

rearrreglo de la cadena H de las Ig, el cual se lleva a cabo en dos etapas: primero se asocian los fragmentos D_H-J_H (pro-B temprano) y luego se une el fragmento V_H al D_HJ_H previamente rearrreglado (pro-B tardío). Tal como se observa en la **Figura 5** la asociación D_H-J_H se produce en ambos cromosomas. Por el contrario, la unión del fragmento V_H al D_HJ_H se intentará primeramente en un cromosoma y en caso de no ser exitoso, se intentará rearrreglar el segundo cromosoma. Este fenómeno se conoce con el nombre de **exclusión alélica** y garantiza que sólo se exprese la cadena H de uno de los dos alelos del genoma.

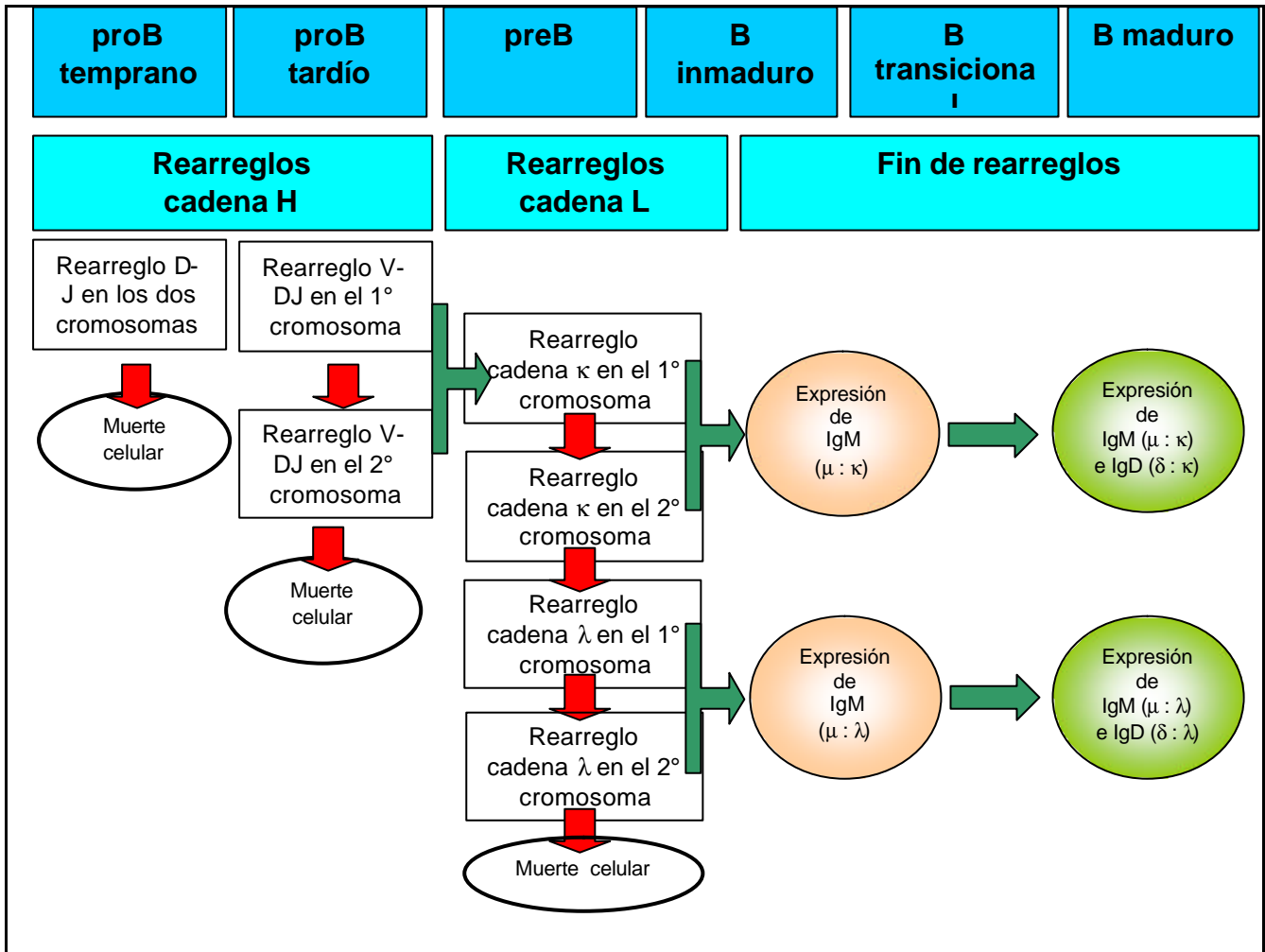


Figura 5

La ausencia de rearrreglos exitosos de la cadena H lleva a la apoptosis del linfocito B. El rearrreglo productivo de la porción V_H permite la expresión en la membrana de una cadena pesada μ ($H\mu$) asociada con dos proteínas producidas por el linfocito que están unidas en forma no covalente constituyendo una cadena liviana sustituta (Ls). El ensamblado de la cadena H rearrreglada a la cadena Ls y su asociación al heterodímero $Ig\alpha I g\beta$ en la membrana del linfocito constituye el pre-BCR. La presencia del pre-BCR en la membrana caracteriza el siguiente estadio de maduración denominado **pre-B**, en donde los linfocitos finalizan con los rearrreglos de la cadena H, realizan varios ciclos de proliferación y comienzan posteriormente a rearrreglar la cadena L. De esta manera, cada una de las células hijas de la progenie que poseen genes de cadena H ya rearrreglados recombinan

en forma independiente los fragmentos de la porción variable de la cadena L, aumentando nuevamente la diversidad. Para que todo esto sea posible, se necesita la transducción de señales de sobrevida del pre-BCR. Si bien hasta el momento no está claro qué es lo que gatilla la transducción de la señal a través de dicho receptor, existen evidencias que indican que la proteína quinasa Btk está involucrada. En este sentido, los pacientes que presentan mutaciones en dicha proteína (enfermedad de Bruton) poseen los linfocitos arrestados en el estadio pro-B.

Los rearreglos de la porción variable de la cadena L también están gobernados por el fenómeno de exclusión alélica e involucran la asociación de fragmentos V_L y J_L . Existen dos tipos distintos de cadena L: la cadena liviana kappa (L_k) o la lambda (L_λ). Primeramente se intentará un rearreglo productivo de la cadena L_k en uno de los cromosomas y, en los casos en que no se consiga, se procederá a intentar rearreglar esa misma cadena en el otro cromosoma. Si estos intentos no fueran exitosos, comenzarán los rearreglos de la cadena L_λ , primero en un cromosoma y luego en el otro. Normalmente, un 65% de linfocitos B logra un rearreglo exitoso de cadena L_k , mientras que el restante 35% presenta rearreglos productivos de la cadena L_λ . No existen linfocitos con rearreglos no productivos de cadena L ya que éstos no son viables y mueren por apoptosis.

Una vez que los genes de la cadena L son rearreglados exitosamente, la cadena L comienza a sintetizarse y se combina con la cadena H_μ a fin de formar la molécula de IgM. Dicha molécula se expresará en la membrana junto con el heterodímero $Ig\alpha-Ig\beta$ constituyendo el BCR de clase IgM característico del estadio **B inmaduro**.

En las etapas de maduración de los linfocitos B que hemos visto hasta el momento lo crucial es generar rearreglos productivos de los genes de cadena H y L que permitan la expresión de una molécula de Ig en la membrana. Aquellas células que logran generar su receptor antigénico y expresarlo pueden avanzar a la siguiente etapa de maduración, en donde los mecanismos de control cambian el foco de atención hacia la especificidad del BCR. Es decir que, una vez que el linfocito alcanza el estadio B inmaduro y expresa el BCR en la membrana, dicho receptor será evaluado en función de su capacidad de reconocer antígenos presentes en el ambiente del órgano linfático primario. La finalidad de esta "evaluación" es controlar a aquellos linfocitos cuyos BCR pueden reconocer moléculas propias, los cuales serían potencialmente peligrosos ya que podrían generar respuestas de tipo autoinmunes. Este proceso de "evaluación" se conoce como inducción de **tolerancia central**. La especificidad y la avidéz del receptor por esos antígenos determinará el camino a seguir por el linfocito: sobrevivir y continuar madurando, o morir por apoptosis sin alcanzar la madurez.

Inducción de tolerancia central de linfocitos B

Los linfocitos B inmaduros que no reciban señal alguna a través de su BCR en la médula ósea, son capaces de salir del órgano para continuar con su proceso de maduración en el bazo. Por el contrario, aquellos linfocitos B inmaduros capaces de reconocer antígenos propios en la médula ósea son considerados peligrosos y "controlados" a través de diversos mecanismos dependiendo de la intensidad de la señal recibida por el BCR. Es así, que los que reciben una señal intensa a través

del BCR morirán por apoptosis en la médula ósea. Antes de morir, al linfocito B inmaduro se le da la oportunidad de reemplazar el BCR autorreactivo por otro que no lo sea, a fin de evitar la muerte por apoptosis. Este proceso se conoce con el nombre de **edición del receptor**. Si el nuevo BCR generado no es autorreactivo, el linfocito B inmaduro no entra en apoptosis y sale de la médula ósea para continuar su proceso de maduración. Si los distintos intentos de "editar" el BCR continúan generando un receptor autorreactivo, la célula morirá por apoptosis en la médula ósea.

Por otro lado, aquellos linfocitos B inmaduros que en la médula ósea reciban señales débiles a través de su BCR, serán inactivados y entrarán en un estado permanente de no-respuesta, también denominado **anergia**. Estos linfocitos autorreactivos abandonan la médula ósea pero, al no ser capaces de activarse en la periferia, mueren relativamente pronto.

Vale la pena mencionar que, dado que no todos los antígenos propios pueden alcanzar la médula ósea a fin de protagonizar la inducción de tolerancia central B, muchos de los linfocitos B que continúan con su proceso de maduración poseen BCR capaces de interactuar con moléculas propias. Dichos linfocitos son controlados en la periferia, a través de mecanismos de inducción de **tolerancia periférica**.

Maduración periférica de linfocitos B

Del total de linfocitos B inmaduros que se genera diariamente sólo un pequeño porcentaje logra salir de médula ósea y alcanzar el bazo, donde continúan con su proceso de maduración. ¿Por qué se generan tantos linfocitos B inmaduros y sólo algunos sobreviven? Todavía esta pregunta sigue sin tener una respuesta clara pero probablemente, la mayoría de los linfocitos B inmaduros sean seleccionados negativamente en la médula ósea durante la inducción de tolerancia central debido a que sus BCR son capaces de reconocer moléculas propias. Sólo aquellos linfocitos B inmaduros, que sobrevivan a la inducción de tolerancia central, saldrán de la médula ósea hacia el bazo, el órgano donde culminarán su maduración. En este estadio los linfocitos B, que se encuentran en la periferia en un estado de transición entre el estadio B inmaduro y maduro, reciben el nombre de linfocitos **B transicionales (BTr)**. Dentro de esta población de linfocitos pueden diferenciarse dos subpoblaciones bien definidas, BTr de tipo 1 (BTr1) o de tipo 2 (BTr2), que se encuentran en el bazo ubicadas en distintos lugares anatómicos.

Durante el estadio BTr1, los BCR de dichos linfocitos también son "controlados" y sufren un proceso de selección negativa si reciben señales a través de su BCR para reconocer moléculas propias. A través de este mecanismo de inducción de tolerancia periférica, nos aseguramos que los linfocitos B autorreactivos que han sobrevivido a la inducción de tolerancia central en la médula ósea no continúen su desarrollo y mueran por apoptosis en el bazo. Posteriormente, aquellos sobrevivientes, darán lugar a los BTr2, los cuales aparentemente necesitan recibir señales de sobrevivencia a través de su BCR, aún no bien definidas, para alcanzar el estadio de **B maduro**.

Numerosas evidencias demostraron que es necesaria además la presencia de ciertos factores de sobrevivencia, tales como la citoquina BAFF, para la transición de los linfocitos BTr1 hacia el estadio BTr2 y B maduras. Una vez que los linfocitos han alcanzado su madurez, co-expresan en su

membrana BCR de tipo IgM e IgD, sin embargo presentan una única especificidad dada por la porción variable de las *Igs*, que es idéntica. Esto se explica gracias a que una misma porción VH generada por recombinación somática puede asociarse con los genes $C\mu$ (para dar la IgM) ó $C\delta$ (para dar la IgD).

Conclusiones

Los linfocitos B, al igual que el resto de las células del sistema inmune, se originan en la médula ósea a partir de un precursor común. Existen miles de millones de linfocitos B distintos entre sí, cada uno de los cuales expresa en su membrana un receptor antigénico particular. La naturaleza se las ha ingeniado para generar semejante diversidad de receptores utilizando sólo un conjunto de genes, los cuales son rearrreglados en forma distinta en cada uno de los linfocitos B en desarrollo.

Debido a cómo se generan las inmunoglobulinas, una vez que el BCR puede ser expresado en la membrana, necesariamente deben existir mecanismos de control que evalúen la especificidad del mismo. Si bien durante la ontogenia de linfocitos B la mayoría de las células mueren por apoptosis antes de alcanzar la madurez, este proceso, lejos de ser un gasto innecesario de energía, mantiene el delicado equilibrio entre la diversidad y la autoinmunidad. El proceso de generación de las inmunoglobulinas nos asegura la gran diversidad necesaria para estar protegidos contra la amplísima variedad de microorganismos existentes, sin embargo esta situación acarrea conjuntamente la aparición de rearrreglos capaces de interactuar con moléculas propias. Es por ello que existen numerosos mecanismos de control para evaluar la especificidad de las inmunoglobulinas generadas, a fin de evitar la aparición de fenómenos autoinmunes.

Aquellos linfocitos que sobreviven a los mecanismos de control y alcanzan el estadio B maduro, co-expresan en su membrana BCR de tipo IgM e IgD, los cuales son específicos para antígenos que aún no conocen, por lo que también reciben el nombre de linfocitos B vírgenes. Dichas células comienzan un tráfico linfocitario en busca del antígeno para el cual son específicas y, aquellas que lo encuentren, podrán activarse, proliferar y diferenciarse a células productoras de anticuerpos. Estos anticuerpos tendrán la capacidad de reconocer al antígeno específico y reclutar distintos mecanismos efectores a fin de destruirlo.

Agradecimientos:

A la Dra. Mirta Giordano, por su crítica revisión del manuscrito.

Referencias.

Tonegawa S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302:575.

D Zipori , 1992. The renewal and differentiation of hemopoietic stem cells. *FASEB J.*, 6:2691.

Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M., 1993. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *Journal Experimental Medicine*, 177:999.

E Beutler, M Lichtman, B Collier and T Kipps. 1995. *Williams Hematology*. Fifth edition. Mc Graw Hill, New York, p211.

Sandel PC, Monroe JG., 1999. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity*, 10:289.

Marcel Batten, Joanna Groom, Teresa G. Cachero, Fang Qian, Pascal Schneider, Jurg Tschopp, Jeffrey L. Browning, Fabienne Mackay, 2000. BAFF Mediates Survival of Peripheral Immature B Lymphocytes. *Journal Experimental Medicine*, 192:1453.

Richard R. Hardy, yoko Hayakawa, 2001. B cell development pathways. *Annual Review of Immunology*, 19:595.

Charles Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik, 2001. *Immuno Biology*. The immune system in health and disease. 5th edition, Garland Publishing.

Stephen B. Gauld, Joseph M. Dal Porto, John C. Cambier, 2002. B Cell Antigen Receptor Signaling: Roles in Cell Development and Disease. *Science*, 296:1641.

Freddy Radtke, Anne Wilson and H Robson MacDonald, 2004. Notch signaling in T- and B-cell development. *Current Opinion in Immunology*, 16:174.

Antonius G. Rolink, Jan Andersson, Fritz Melchers, 2004. Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development. *Immunological Reviews*, 197:41.

Thomas T. Su, Beichu Guo, Bo Wei, Jonathan Braun, David J. Rawlings, 2004. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunological Reviews*, 197:161.

Mila Jankovic, Rafael Casellas, Nikos Yannoutsos, Hedda Wardemann, Michel C. Nussenzweig, 2004. Rags and regulation of autoantibodies. *Annual Review of Immunology*, 22:485.

* Dra. Romina Gamberale.

Laboratorio de Inmunología, IIHema, Academia Nacional de Medicina.

E-mail: rgamberale@hematologia.anm.edu.ar

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**

Número 3, año 3, septiembre 2004

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

“Del vuelo de las proteínas y de cómo lograrlo”

(Espectrometría de masa ESI)

Rosa Erra-Balsells

CIHIDECAR-CONICET, Departamento de Química Orgánica,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Recibido 16 de agosto de 2004

Aceptado 30 de agosto de 2004

Resumen

El método “electrospray” (ESI-MS) ha extendido el uso de la espectrometría de masa con ionización. La una gran variedad de compuestos que incluyen proteínas, glicoproteínas, oligosacáridos, nucleótidos (ADN, ARN y oligonucleótidos), fullerenos, polímeros sintéticos, compuestos inorgánicos y organometálicos entre otras especies termolábiles. Sin embargo, lo que distingue fundamentalmente a este método de ionización extremadamente suave del denominado UV-MALDI es la producción preferencial de iones gaseosos policargados y la posibilidad de su generación a partir de macromoléculas biológicas termolábiles donde la presencia de interacciones nativas no covalentes permanece inalterada. Esta característica es la base de su uso para estudiar desde el punto de vista estructural, cinético y termodinámico interacciones entre biomoléculas del tipo complejos proteína-proteína, complejos enzima-inhibidor, o interacciones del tipo centro activo proteico-fármaco o ADN-fármaco. El proceso de plegado y desplegado de proteínas también se puede estudiar con esta técnica. Estas aplicaciones especiales sumado al hecho de que constituye la interfase entre técnicas separativas en fase líquidas (LC, HPLC, HPCE, SEC, IEC) y la espectrometría de masa, son los factores que han contribuido al uso atractivo de la ESI-MS en áreas tan diversas como biotecnología, bioanalítica, biología molecular, química medicinal y farmacéutica y nuevos materiales incluyendo organometales y polímeros sintéticos.

Palabras clave: ionización “electrospray”, ESI, proteómica, complejos no-covalentes; complejos proteicos

“About how to get the proteins to fly”

(ESI mass spectrometry)

Abstract

Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) has made MS a viable analytical technique to study a wide range of thermally labile compounds including proteins and glycoproteins, nucleotides (including DNA, RNA, and oligonucleotides), fullerenes, synthetic polymers, inorganic and inorganic organometallic compounds. The basic difference between soft ionization methods as UV-MALDI and ESI is that the latter provides an inherently “gentle” ionization that has been shown to produce intact multi charged ions from thermally labile biological molecules even biologically relevant native noncovalent complexes. This latter capability provides the basis for studying structurally, cinetically and thermodynamically point of view specific biomolecular interactions, including protein-protein complex, enzyme-inhibitor interactions, active site protein-drug interactions and DNA-drug interactions. Folding and unfolding protein process is also studied. These attractive features together with the fact that ESI-MS can be hyphenated to analytical chromatography methods dealing with liquid solutions (LC, HPLC, HPCE, SEC, IEC, etc.) have made electrospray ionization a topic of intense research activity in recent years and has resulted in rapid acceptance and use in the biotechnology, bioanalytical, molecular biology, medicinal chemistry, pharmaceutical, new materials as organometallic and synthetic polymers research communities.

Key words: electrospray ionization, ESI, proteomics, non-covalent complex, protein-protein complex.

Introducción

Desde la década del 90 la espectrometría de masa (MS) se ha transformado en una técnica analítica indispensable en el campo de la química biológica. En términos generales permite hacer determinaciones estructurales, identificaciones y análisis de trazas. Es en la actualidad una alternativa muy atractiva que reemplaza a la utilísima secuenciación de Edman de polipéptidos y a métodos clásicos usados para la identificación de modificaciones post-transcripcionales. Permite, además, estudiar interacciones de tipo no covalentes, por ej. estudios de la unión antígeno-anticuerpo que permiten identificar los ligandos específicos a determinados receptores. La combinación de la MS con la electroforesis bidimensional (2-D GE) y las técnicas analíticas separativas líquidas (LC, HPLC, HPCE, SEC, IEC) permite identificar proteínas. La miniaturización de la escala de trabajo al nano-litro y al nano-flujo han optimizado las características de esta técnica en lo que se refiere a tiempo y sensibilidad.

Toda esta revolución se debe a que a fines de la década del 80 se introdujeron dos métodos suaves para la volatilización / ionización de moléculas termolábiles. En la actualidad podemos decir que estos métodos de ionización, ESI y UV-MALDI [1], son complementarios (Fig. 1). El primero requiere disponer del analito en solución, en un medio polar, introducido en forma de flujo continuo a la región donde se aplica un elevado campo eléctrico. El segundo requiere disponer del analito sólido mezclado con un fotosensibilizador (matriz) depositado sobre el electrodo al que se aplicará un campo eléctrico luego de haber sido bombardeado por un láser UV [1]. Ambos son suficientemente suaves, de manera que

generan iones moleculares gaseosos intactos. El primero genera para un dado analito de peso molecular m , una familia de iones moleculares gaseosos policargados (m/z ; m , peso molecular; z , carga; $z=1, 2, 3, \dots, n$; $m/1, m/2, \dots, m/n$) mientras que el segundo genera preferentemente el ión molecular gaseoso monocargado (m/z ; $z=1$; $m/1$).

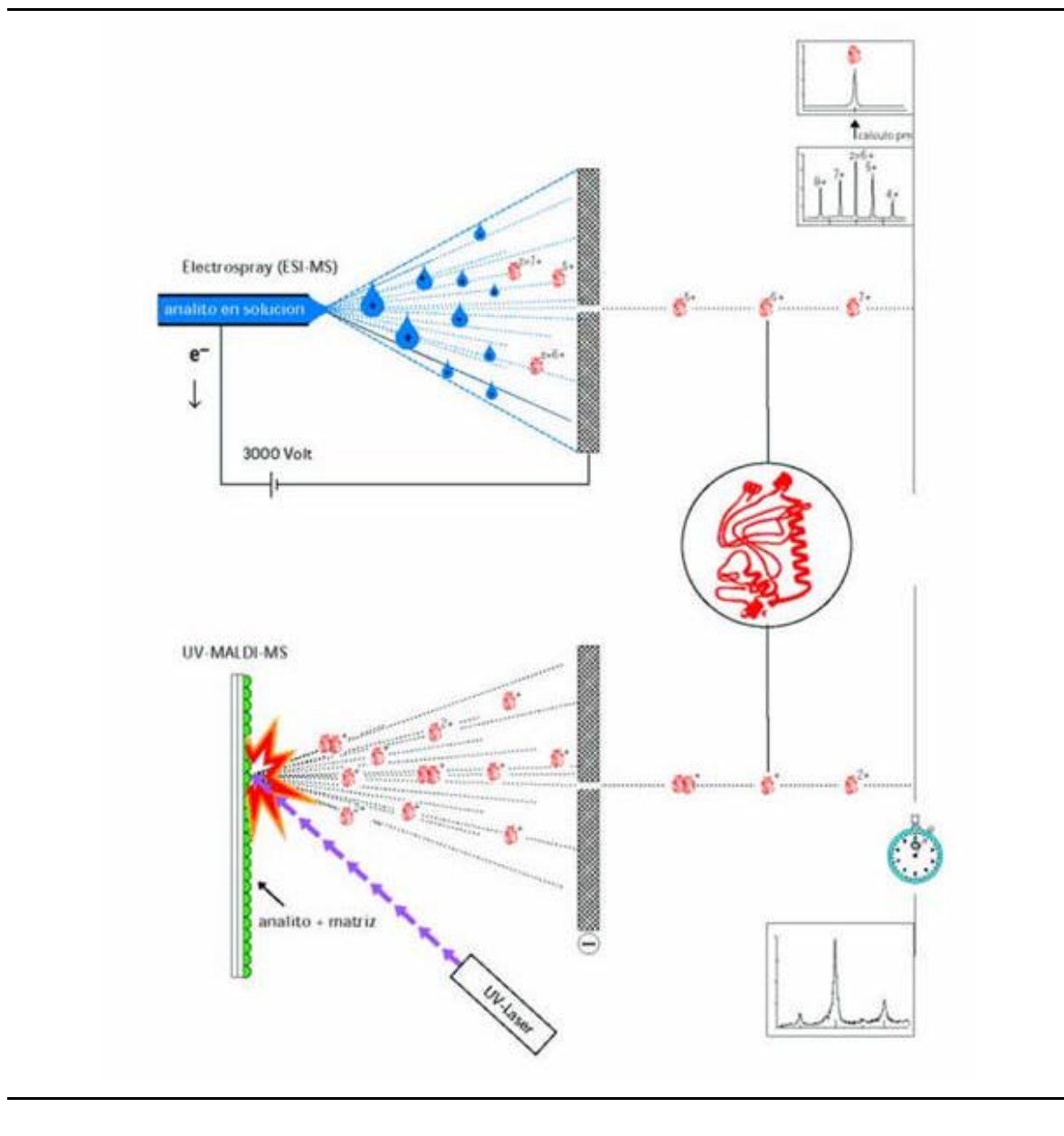


Figura1. MS de macromoléculas. En ESI-MS se generan varios iones a partir del ión molecular (m), de diferente m/z , con $4 < z < 8$. A partir de ellos se calcula el valor de m (peso molecular) (superior). En UV-MALDI se genera el ión molecular monocargado ($z=1$), pequeñas proporciones del ión doblemente cargado ($m/2$), y del dímero ($2m/1$).

El sueño se hizo realidad...”Las macromoléculas vuelan porque ESI da alas a moléculas elefánticas”

Como se detalla en el artículo precedente [1], uno de los desafíos en la década de los 80 era encontrar la forma de analizar compuestos de alto peso molecular, termolábiles por espectrometría de masa, y además, convertir a esta técnica en el detector de las técnicas analíticas separativas en fase líquida (técnicas cromatográficas para analitos en solución líquida; LC, HPLC, HPEC, SEC, IEC) [2]. La introducción de la técnica de ionización basada en la generación, a partir de la solución del analito, de una nube (“spray”) formada por diminutas gotas cargadas eléctricamente, que es sometida a la acción de una fuerte campo eléctrico, convirtió ese ansiado sueño analítico en realidad [2]. A este método de ionización se lo llamó “electrospray” (ES) y las diferentes mejoras tecnológicas han conducido al método de ionización que hoy conocemos como “electrospray ionization” (ESI) y que llevó a John B. Fenn [3] a compartir con el Ing. Tanaka el Premio Nobel de Química 2002 [1]. Se trata del método de volatilización / ionización de analitos más suave que se conoce a tal punto, que se ha demostrado que material viral sometido a este método de ionización mantiene intacta su actividad luego de ser sometido a tal proceso [4].

Como dijo Fenn: “Las macromoléculas vuelan porque ESI da alas a moléculas elefánticas” ([Fig. 2](#)) [3].

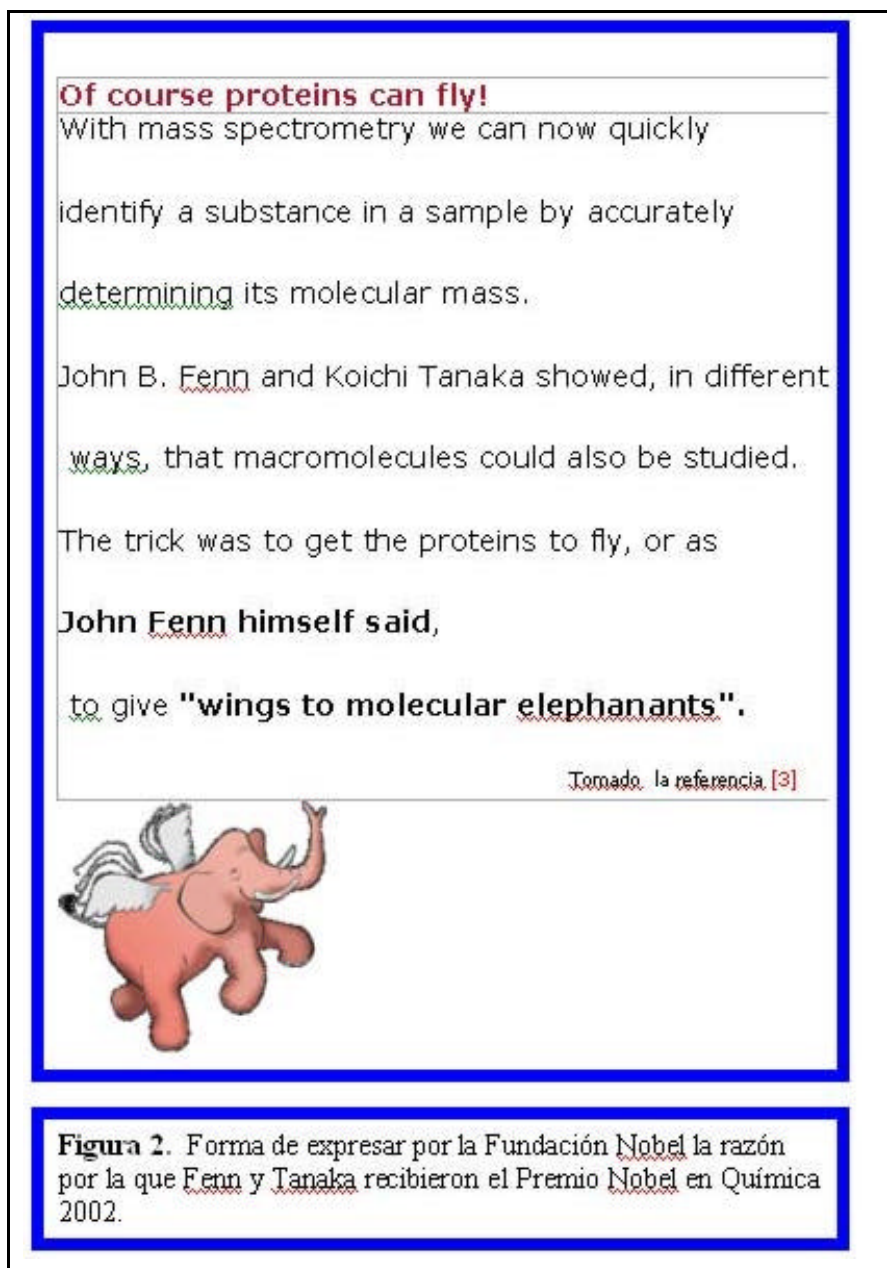
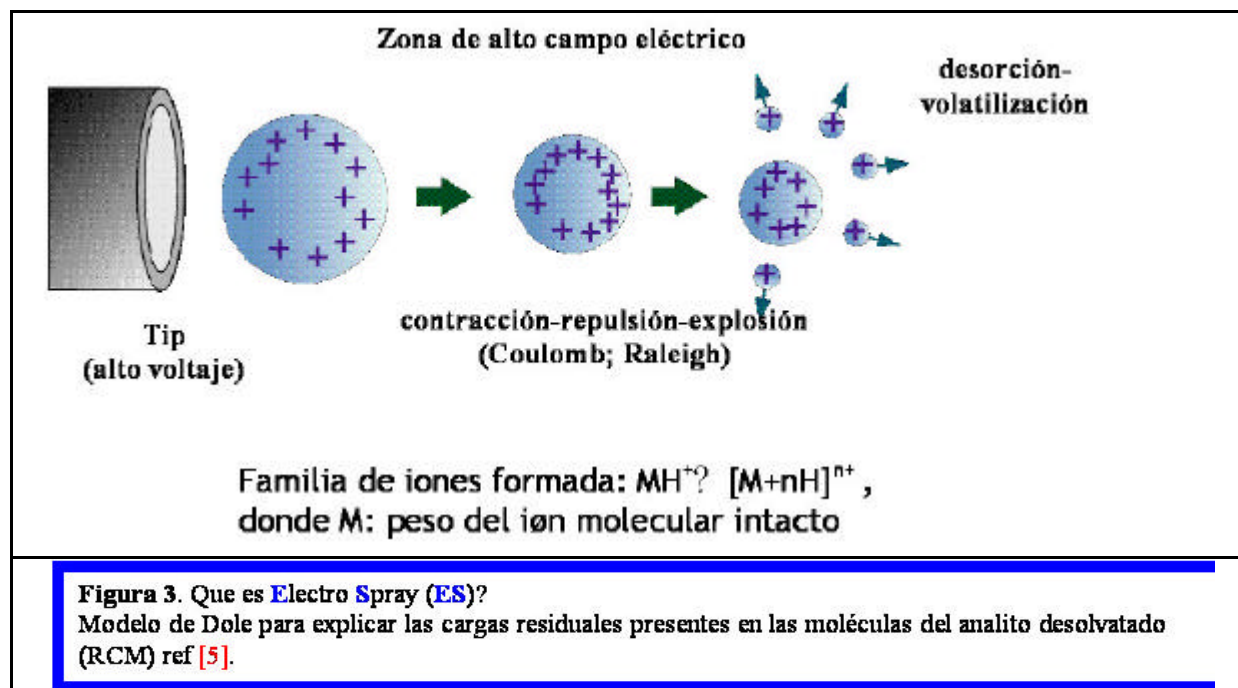


Figura 2. Forma de expresar por la Fundación Nobel la razón por la que Fenn y Tanaka recibieron el Premio Nobel en Química 2002.

Un poco de historia acerca del desarrollo del método de ionización ESI

A la descripción de los experimentos iniciales efectuados por el físico John Zeleny en 1917 siguió la primera explicación lógica del fenómeno de la generación de una nube con microgotas cargadas efectuada por Malcolm Dole recién en 1968 [5]. Esta descripción del principio por el que se produce el "electrospray" (ES) y su comportamiento bajo la acción de un fuerte campo eléctrico, incluye el modelo que contempla la formación de cargas residuales (CRM) el que ha sobrevivido como la mejor descripción física del enigmático proceso de ionización por "electrospray" (ESI) (Fig. 3). De acuerdo a este modelo, las

microgotas cargadas electrostáticamente sometidas a un fuerte campo eléctrico, sufren primero una contracción de volumen y sus componentes pasan al estado gaseoso, cuando el número de cargas electrostáticas del mismo signo, que se encuentran en la superficie, es mayor que las que puede estabilizar una gota del mismo tamaño teniendo en cuenta las repulsiones de Coulomb. En ese momento, se produce la “explosión de Raleigh” que no es más que la eyección de moléculas de la superficie de la gota que pasan al estado gaseoso llevándose una o varias cargas, con el objeto de disminuir el número de cargas y las fuerzas repulsivas en la superficie. Esta “explosión” origina a una microgota cargada de tamaño menor, la cual sigue teniendo en su superficie un número alto de cargas electrostáticas del mismo signo. Ésta bajo la acción del fuerte campo eléctrico vuelve a contraerse. Si en esta gota menor no se cumple de nuevo la relación número de cargas repulsivas a superficie total de la gota adecuada, vuelve a producirse una “explosión de Raleigh”, con pasaje al estado gaseoso de más moléculas mono o policargadas componentes de la gota. Esta sucesión de contracciones-explosiones (evaporaciones superficiales) – disminución del tamaño de la gota –contracciones- explosiones (evaporaciones superficiales) – etc., va generando moléculas gaseosas ionizadas de los componentes de la gota original y por lo tanto, de la solución de partida (Fig. 3). Las fuerzas repulsivas que provocan estas explosiones no inducen en general la ruptura de uniones químicas. Por lo tanto, es posible generar, a partir de soluciones diluídas, iones moleculares gaseosos intactos de cualquier analito presente en la solución. La particularidad de este método de volatilización / ionización no es solamente su “suavidad” (producción del ión molecular intacto) sino además la generación de una familia de iones debido a que el ión molecular intacto puede alojar un número variable de cargas (ion molecular policargado; m/z , para un dado m , z , familia de número de cargas; $z = 1, 2, 3, \dots, n$).



La mayor o menor capacidad que tendrá el analito para generar moléculas gaseosas cargadas y el número de cargas (z), depende directamente del peso molecular (m) y del carácter polar del mismo, o sea de su estructura química (tipo y número de grupos funcionales polares presentes). A mayor peso molecular y mayor número de grupos polares, mayor posibilidad de generar iones policargados ($z > 1$) y menor posibilidad de generar iones monocargados ($z = 1$). Además, la mayor o menor capacidad que tendrá el analito para generar iones gaseosos cargados positivamente (cationes) o negativamente (aniones) depende en primer lugar del tipo de grupos polares presentes en su estructura y en segundo lugar de las características del medio (pH, presencia de sales) y del solvente de la solución original (carácter prótico del solvente, polaridad, constante dieléctrica, etc.).

Esta triple dependencia (estructura molecular-medio-solvente) del proceso de ionización llamado ES y su suavidad, indica por un lado el campo de aplicación del mismo el cual si bien en principio parecería limitarse al ámbito de las moléculas polares en medios polares se extiende al de las moléculas polarizables mediante modificaciones adecuadas del medio donde se las disuelve (cambio de pH, agregado de sales cuyos cationes forman complejos gaseoso estables cargados con la molécula del analito neutro, etc.).

Cabe señalar que, dependiendo de los factores antes mencionados, para un analito M su ionización en modo positivo puede deberse a la fijación de (i) n protones: $[M(H)n]^{n+}$, (ii) m ó p cationes (Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , etc.): $[M(Na)m]^{m+}$, $[M(K)p]^{p+}$, etc., (iii) la combinación de n protones y m y p cationes: $[M(H)n]^{n+}$, $[M(H)n(Na)m]^{(n+m)+}$, $[M(H)n(Na)m(K)p]^{(n+m+p)+}$, $[M(H)n(K)p]^{(n+p)+}$, $[M(Na)m]^{m+}$, $[M(K)p]^{p+}$, $[M(Na)m(K)p]^{(m+p)+}$, etc. donde todas las combinaciones y valores de n , m y p son posibles. En modo negativo normalmente se produce la pérdida de protones $[M-(H)n]^{-}$ y/o la pérdida de cationes en compuestos salinos: ej. para un compuesto M , de estructura $M = N(SO_4Na)_m$, pueden formarse la familia de aniones $\{[N-(SO_4Na)_m]^{-}nNa\}^{-}$ con $m \geq n$. Esta complicación adicional en cuanto a que los iones policargados múltiples que se pueden formar dependen no sólo de la estructura del analito sino además de los componentes de la solución (pH, sales) son una fuerte desventaja del método de ionización ESI frente al método de ionización suave UV-MALDI. La pureza del analito y de la solución es crítica en el primero ([Fig. 4](#)) (Tabla 1).

ESI y UV-MALDI

Para un analito M su ionización por **ESI** puede deberse a:

Modo positivo:

- (i) la fijación de **n** protones: $[M(H)_n]^+$, $n = 1, \dots, n$
- (ii) la fijación de **m** o **p** cationes (Na, K, Li, Cs, etc.): $[M(Na)_m]^+$, $[M(K)_p]^+$, etc.,
- (iii) la fijación combinada de **n** protones y **m** y **p** cationes: $[M(H)_n]^+$, $[M(H)_n(Na)_m]^+$, $[M(H)_n(Na)_m(K)_p]^+$, $[M(H)_n(K)_p]^+$, $[M(Na)_m]^+$, $[M(K)_p]^+$, $[M(Na)_m(K)_p]^+$, etc. con n, m y p variando entre $1, \dots, n; 1, \dots, m; 1, \dots, p$.

Modo negativo:

- (i) pérdida de **n** protones: $[M-(H)_n]^-$, con $n = 1, \dots, n$
- (ii) pérdida de **n** cationes en compuestos salinos:
 ej. M, de estructura $M = N-(SO_3Na)_m$, formará $\{N-(SO_3Na)_m - nNa\}^-$ con $m \geq n$
 y $n = 1, \dots, n$

Para un analito M su ionización por **UV-MALDI** puede deberse a:

Modo positivo:

- (i) la fijación de **1** protón: $[MH]^+$
- (ii) la fijación de **1** catión (Na, y/o K, y/o Li, y/o Cs, etc.): $[MNa]^+$, $[MK]^+$, etc.,

Modo negativo:

- (i) pérdida de **1** protón: $[M-H]^-$
- (ii) pérdida de **1** catión en compuestos salinos:
 ej. M, de estructura $M = N-(SO_3Na)_m$, formará el ión $\{N-(SO_3Na)_m - Na\}^-$

EL GRADO DE PUREZA DE ANALITO Y SOLUCIONES CRITICO EN ESI

Figura 4. Iones preferentemente generados por ESI y por UV-MALDI.

Tabla 1. ESI-MS y UV-MALDI-MS: características, utilidad, ventajas, desventajas y campo de aplicación.

Método de ionización	Límite pm teórico/Da (práctico/Da)	Rango dinámico m/z medible teórico/Da (práctico/Da)	Ventajas	Desventajas	Campo de aplicación
UV-MALDI	>300000 (~ 200000)	23- >300000 (23-200000)	-Ión único (m/z , $m=pm$; $z=1$) en modos (+) y (-). -Bajo efecto de sales (~ mM). -Análisis de mezclas (ej.: huella peptídica; oligómeros). -MS ⁿ (fragmentación) estructura del compuestos: ej. secuenciación de proteínas. -Sensibilidad: fmol-atmol.	-Interferencia de la matriz. - No útil como detector ifenado a métodos separativos (GC/GCL/LC/HPLC/HPCE). -Analítica s/muestra sólida. -No útil para compuestos que absorben a la lem del Laser. -Falta de reglas para selección de la matriz adecuada.	-Péptidos -Proteínas -Glicoproteínas -Hidratos de carbono -Glicoconjugados -Nucleótidos -Nuclósidos -Esfingolípidos -Lípidos -Polímeros sintéticos polares y no polares -Moléculas polares pequeñas
ESI	~ 200000 (70000)	23-10000 (23-4000)	-Familia de iones (m/z , $m=pm$; $z = 1, 2, 3, \dots, n$) en modos (+) y (-). -Suave: no rompe interacciones débiles no covalentes (ej, complejos proteicos; organometales). -MS ⁿ (fragmentación) estructura del compuestos: ej. secuenciación de proteínas. -Sensibilidad: fmol-atmol. -Analítica sobre muestra en solución. -Gran utilidad como detector ifenado a métodos separativos (LC; HPLC; HPCE; SEC; IEC)	-Analitos puros. -Familia de iones moleculares policargados confunde el análisis de mezclas. -No útil para mezclas. -Interferencia de sales. -Sólo para analitos polares y/o polarizables. -Sólo solventes polares. -Mantenimiento: frecuente por contaminación de la cámara de ionización.	-Péptidos -Proteínas -Glicoproteínas -Hidratos de carbono -Glicoconjugados -Nucleótidos -Nuclósidos -Esfingolípidos -Organometales -Inorgánicos -Polímeros sintéticos polares y polarizables -Moléculas polares pequeñas.

En los experimentos que describió Dole en 1968 [5] usó un gas inerte adicional para facilitar la desolvatación irreversible (separación irreversible de moléculas del analito y del solvente en el estado) gaseoso durante la “explosión de Raleigh”. En otros experimentos se mejoraba la eficiencia de la generación de moléculas gaseosas cargadas del analito en cuestión completamente “desorbidas” o libres de moléculas de solvente, calentando el conducto o aguja metálica o “tip” (Fig. 3) por el que circula la solución que va a ser volatilizada / ionizada por ES y al que se aplica un alto voltaje. Esta es la denominada “thermo spray ionization” (TES) [2,3] que es la base de la “atmospheric pressure chemical ionization” (APCI) [2].

Pero...si la técnica de ionización de moléculas por nebulización llamada ES se conocía desde la década del 60, ¿porqué recibe John B. Fenn el Premio Nobel en el año 2002? ¿Cuál ha sido su contribución?

Lo que conocemos hoy como método de volatilización / ionización ESI de real utilidad para moléculas termolábiles es una modificación del método de Dole, que Fenn presenta en un simposio en San Francisco (USA) en 1988 (Fig. 5) [6]. En dicha comunicación se describió la identificación de polipéptidos y proteínas de peso molecular 40 kDa. Fenn demostró que era posible determinar, a partir de la familia de iones generada debido a la policarga de un mismo ión molecular m , su peso molecular con una exactitud del 0,01%. Para ello, teniendo en cuenta la abundancia isotópica natural de cada elemento constituyente, se simulaba matemáticamente cuál era la mejor combinación de átomos en el ión molecular (el mejor m) que generaría la familia de iones multicargados obtenida en cada caso experimentalmente. Este resultado fue la culminación de desarrollos tecnológicos y de modelado matemático que se venían haciendo en el laboratorio de Fenn, en Yale, desde 1984 [7]. En ese año se efectuó exitosamente la utilización del “electrospray” como método de volatilización / ionización en un espectrómetro de masa. Fenn usó su conocimiento sobre el proceso denominado “free-jet expansion” en la interfase líquido-gas ionizado, y en cooperación con el especialista japonés en “jets” profesor Yamashita, modificó el arreglo experimental del ES descrito por Dole [5]. Entre otras cosas se agregó un gas inerte adicional para optimizar el proceso de desolvatación (“drying gas”), eliminando el proceso inverso o re-solvatación del ión gaseoso macromolecular formado, sin necesidad de calentar el “tip” o “needle” metálico y la cámara de ionización y/o la solución de analito que se introduce en flujo a través del “tip” (“needle”) (Fig. 5).

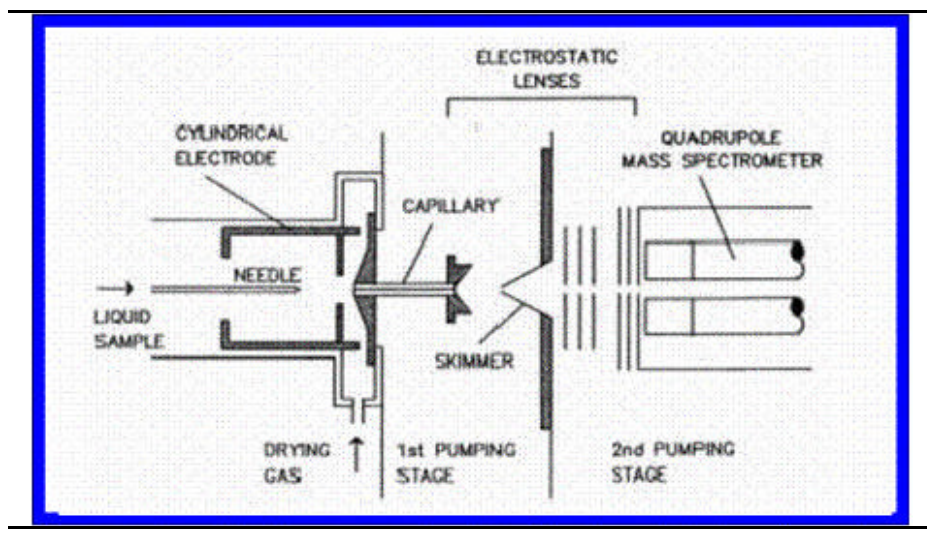


Figura 5. Esquema del arreglo patentado por Fern como ESI-MS [3].

Por un lado eliminó el calentamiento que induce la descomposición de moléculas termolábiles. En segundo lugar modificó la forma de coleccionar y analizar a los iones producidos. En reemplazo de la caja de Faraday conectada al galvanómetro de Dole [3, 5-7], luego de coleccionar y obligar a pasar el haz de iones por un “primer agujero coleccionador” (nozzle), y en segundo lugar “a través de una espumadera o separador de partículas sólidas” (skimmer) que terminaba de separar las moléculas gaseosas de aquéllas que pasan al estado sólido, introdujo a la corriente de moléculas gaseosas policargadas en un “quadruopolo” (Fig. 5). En esa época el “quadruopolo” ya se usaba exitosamente como un analizador de iones de muy buena resolución para rangos de $m/z < 2000$ Da. Se conocían muy bien su usos como filtro de iones y como elemento focalizador de haces de iones (Figs. 5 y 6) [2,3].

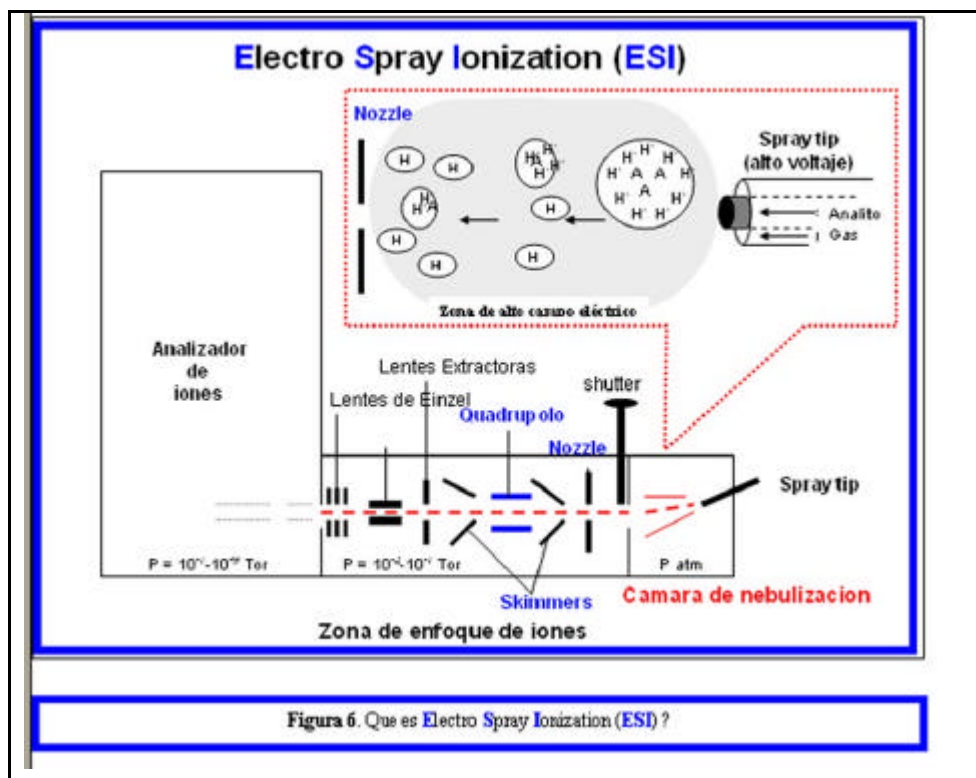


Figura 6. Que es Electro Spray Ionization (ESI) ?

En forma casi simultánea, el grupo liderado por el profesor Aleksandrov en Rusia efectuó una mejora muy similar al ya conocido método de Dole, con el mismo objeto de mejorar la generación de moléculas gaseosas iónicas a partir de soluciones de analitos termolábiles [8].

Como se muestra en la Fig. 6, la cámara de ionización ESI consta siempre de dos partes: (i) la cámara de nebulización y (ii) la zona de enfoque de iones. La primera se encuentra a presión atmosférica la segunda con vacío intermedio ($10^{-2} - 10^{-4}$ Torr). En la primera al "tip" se le aplica alto voltaje (2-4 kV), en la segunda siempre están presentes "nozzle", "skimmers" y "quadrupolo". Según sea el signo del voltaje aplicado en el "tip" y en el "nozzle" se analizan cationes (modo positivo) o se analizan aniones (modo negativo).

Acerca de proceso ESI

El proceso ESI está gobernado por una serie de parámetros química y físicos cuya optimización en forma conjunta determina la eficiencia del proceso. El proceso en su conjunto, del principio al final, puede representarse como un circuito eléctrico que genera y controla la nube (spray) de gotitas líquidas cargadas (Fig. 1). El proceso se inicia con el analito generalmente cargado (protonado) y disuelto en un medio con alto contenido acuoso (solvente polar). Al final del proceso el mismo analito como una molécula gaseosa multicargada y desnuda (desolvatada, no interactuado con el solvente) es atraída y

colectada por el orificio de entrada del analizador de masas (nozzle) (Figs 1, 5 y 6). En el alto vacío del analizador (Fig. 6), el analito gaseoso policargado será selectivamente caracterizado por su relación m/z , quedando totalmente en el olvido el hecho de que se trate de un analito de alto peso molecular y termolábil.

Siguiendo con el proceso representado en las Figs. 1 y 3, las pequeñas gotitas inicialmente formadas tienen carga positiva o negativa, dependiendo de la polaridad asignada a la punta metálica del conducto inyector de la solución (electrodo madre del circuito; "tip"). El conjunto de moléculas protonadas o unidas a cationes metálicos (cationes) o deprotonadas (aniones) gaseosas quedan totalmente libres de solvente luego que éste se evapora. Como se muestra en la Fig. 4 en el caso de formarse especies protonadas, el número de cargas es igual al número de protones fijados a los grupos accesibles protonables. Según sea la naturaleza química y el peso molecular del analito, el número z puede variar entre 2 y 40 o ser aún mayor. Si el analito es una especie química única, el espectro resultante mostrará una serie regular de señales que reflejan los diferentes valores de m/z (Fig. 1). El hecho de que se generen familias de señales agrega complejidad a la interpretación de los espectros de masa obtenidos e inicialmente fue un factor de confusión que generaba rechazo en los posibles usuarios.

Había que pasar desde la imagen clásica de los espectros de masa obtenidos mediante otras técnicas de ionización, donde predominan los iones moleculares monocargados a las nuevas imágenes donde cada ión molecular intacto puede generar una familia de iones moleculares intactos policargados.

Sin embargo, se debe a Fenn no solamente el desarrollo tecnológico que optimizó el proceso "free-jet expansion" (y como consecuencia la eficiencia de la volatilización / ionización sin necesidad de calentar el sistema), sino que, además, fue él quién desarrolló los primeros programas de cálculo. Los que mostraron que la complejidad debida a las múltiples señales obtenidas por cada ión molecular, agregaba información para un cálculo más exacto del peso molecular del ión molecular intacto monocargado no detectado (valor de m). Este "secreto" fue revelado por Fenn como la "teoría de la carga múltiple" en una publicación del año 1987 [9]. Esta teoría demostró que los diferentes estados cargados del mismo ión molecular podían interpretarse como medidas independientes del peso molecular del mismo analito y que, por lo tanto, un método de promediación basado en la solución simultánea de una familia de ecuaciones podría proveer una estimación mucho más precisa del peso molecular de macromoléculas.

Como se ve en la Fig. 1, la proteína de peso molecular 47.342 Da es analizada por ESI-MS. El espectro de masa resultante mostró 50 picos debidos a 50 valores diferentes de z (50 cargas diferentes). Las señales resultantes aparecen en la región de m/z 1-2000 Da y pueden ser analizadas muy fácilmente en cualquier analizador de masas. Este conjunto de datos por resolución del sistema de ecuaciones lleva a calcular un peso molecular muchísimo más exacto que el que se obtendría a partir de un solo ión.

Cabe señalar además, que otra de las ventajas del método de ionización ESI es que es el método de ionización de uso actual en espectrometría de masa menos invasivo y modificante de las propiedades del analito, salvo en lo que refiere a su volatilización y ionización. Por dicha razón es posible estudiar

complejos moleculares debidos a débiles interacciones no-covalentes nativas tales como, por ejemplo: complejos proteína-proteína, enzima-sustrato o proteína-ligando (Tablas 1 - 2).

Con la técnica ESI no solamente queda salvado el problema de la termolabilidad sino que además queda tecnológicamente resuelto el problema de volatilizar / ionizar analitos manipulando directamente la solución líquida que los contiene.

El uso de la espectrometría de masa como detector de alta sensibilidad y resolución de técnicas cromatográficas en fase líquida (LC) pasó a ser una realidad (Tabla 1).

ESI vs nano-ESI vs Z-ESI

Ya el mismo Fenn, en sus primeros trabajos, mostró también que la sensibilidad del proceso no se incrementaba aumentando la concentración del analito en la muestra en flujo introducida al sistema. Por el contrario, si el flujo variaba su velocidad de microlitro/min a nanolitro/min la sensibilidad del experimento aumentaba en varios órdenes [10-11]. Se puede alcanzar sensibilidad a nivel del átomo-mol simplemente disponiendo de un "tip" de diámetro menor y disminuyendo el flujo de introducción de muestra y ésta es la diferencia entre la técnica denominada ESI y nano-ESI; la primera trabaja con un flujo de microlitro/min y la segunda de nanolitro/min. Además, cuando se trabaja con el "tip" nano-ESI, éste se lo acerca más al "nozzle" y como consecuencia toda la nube entra a la región de focalización, aumentándose la sensibilidad del método. Mayor sensibilidad y requerimientos 1000 veces menores de muestra !!! (Fig. 7).

ESI vs nano-ESI

Se puede alcanzar sensibilidad a nivel átomo-mol disminuyendo el flujo de introducción de muestra y el diámetro del "tip".

Esta es la diferencia entre la técnica denominada **ESI** y **nano-ESI**

En la primera el flujo es de microlitro/min y en la segunda de nanolitro/min.

Mayor sensibilidad y requerimientos 1000 veces menores de muestra !!!

Figura 7. ESI vs nano-ESI.Cuál es la diferencia?

Una modificación tecnológica posterior, denominada Z-ESI, tiene por objeto disminuir el número de partículas sólidas que llegan al “cuadrupolo” ubicado en la región de enfoque de iones (Fig. 6). Estas partículas se forman durante la nebulización siendo una de las causas la presencia de sales en la solución. Como se muestra en la Fig. 8 mediante un arreglo ortogonal del primer electrodo orientador (electrodo 1) y el primer “skimmer” se desvía una parte de la nube iónica inicial y se la redirecciona mediante un segundo “skimmer” de manera de introducirla al “cuadrupolo” de enfoque. En la actualidad existen tanto cámaras de ionización ZESI (sinónimo de trabajo a escala del microlitro/min) como cámaras de ionización nano-Z-ESI.

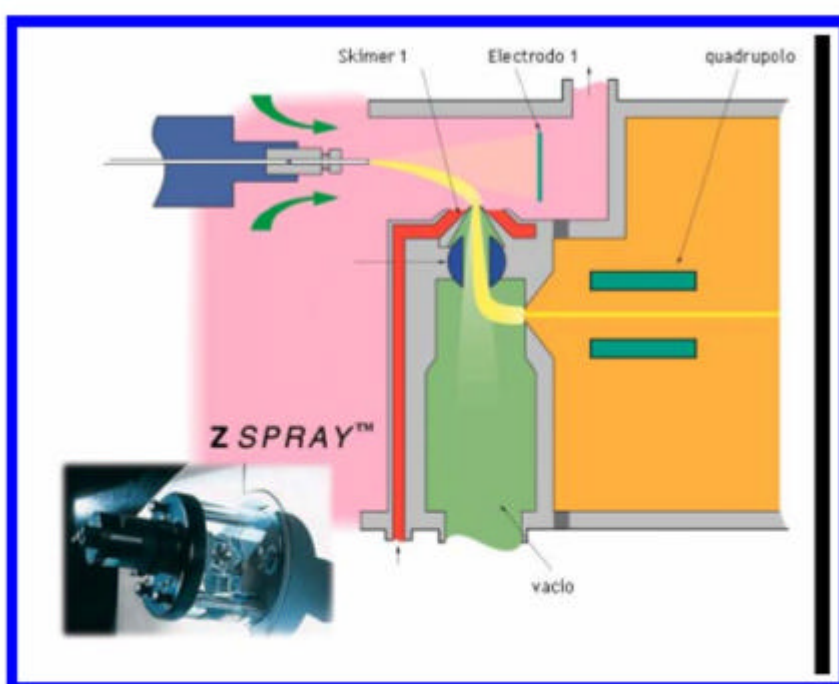


Figura 8. Qué es Z-ESI?
 Vista de la trayectoria en “Z” descrita por la nube iónica o “spray” (en color amarillo) en la cámara de ionización Z-ESI.

Algunos detalles sobre equipamiento con ESI-MS disponible y aplicaciones...

Lo que diferencia drásticamente a los dos métodos de ionización suaves útiles para la volatilización / ionización de moléculas termolábiles, UV-MALDI y ESI, y a su vez al segundo de todos los demás métodos de ionización conocidos (EI, CI, FAB, FI, FD, etc. Ver detalle en [1]), es que en éste se generan iones moleculares gaseosos policargados y que el número de cargas (z) es casi proporcional al número

de grupos polares presentes y al peso molecular. Los iones gaseosos policargados resultantes, normalmente, son iones moleculares intactos de masa m , cuya relación m/z está dentro de los valores que los analizadores convencionales usados en MS hasta fines del 80 podían manipular (colimar, enfocar, frenar, acelerar y detectar) eficientemente [2,12-13]. Por ejemplo, el análisis UV-MALDI-MS de la proteína comercial albumina bovina (pm 66266 Da) muestra una única señal a m/z 67266 (Da) $[(M+H)^+]$, mientras que el análisis por ESI-MS muestra una familia de 25 señales comprendidas entre m/z 1658 y 1020, con $40 < z < 65$ [14].

Por la razón antes señalada, analizadores de uso rutinario en MS de moléculas termoestables de bajo peso molecular, en general, moléculas orgánicas, fueron exitosamente acoplados al ESI. Entre ellos basta mencionar el "cuadrupolo" (Q), la combinación de sectores eléctricos y magnéticos (E-B), el "cuadrupolo tridimensional" o "trampa iónica" (IT) y la "trampa iónica" combinada con un alto campo magnético denominado "fourier transform-ion ciclotron resonance" (FT-ICR) [1,2,12]. Este hecho determinó un rapidísimo desarrollo de la técnica ESI-MS, a tal punto que su rápida y eficaz utilización en el análisis de biomoléculas, hizo pensar a principios y mediados de la década del 90 que era de muchísima mayor utilidad en este campo que el UV-MALDI-MS.

El uso combinado de los analizadores, antes mencionados, para estudiar los procesos de fragmentación de moléculas pequeñas y la secuenciación de estos procesos ha sido muy desarrollado en las espectrometrías de masa convencionales (espectrometría de masa en tándem, MS/MS y en general MS_n). El ensamble del ESI con dichos analizadores en tándem hizo surgir rápida y fácilmente la posibilidad de estudiar (i) la determinación de peso molecular de biomolécula intacta, (ii) la fragmentación del ión molecular de la biomolécula y (iii) la fragmentación selectiva de los iones primarios formados. De esta manera se pudo usar desde los inicios la ESI-MS tanto para determinar peso molecular (experimentos donde se genera el ión molecular intacto) como para determinar estructura química (experimentos donde se induce la fragmentación del ión molecular) (uso de CAD; CID; "electron capture dissociation" ECD, "infra-red multi photon decomposition" IRMPD; ver modos de inducir fragmentación en la primer parte de este artículo [1]). En el análisis de proteínas y polipéptidos, el estudio de la fragmentación de las distintas generaciones de iones formados (fragmentación de ión molecular o ión padre, fragmentación del hijo, fragmentación del nieto, etc., etc.) permite determinar la estructura primaria o secuencia de los aminoácidos (Tabla 2) [1, 15-16]. En realidad la exitosa irrupción de la espectrometría de masa en el campo de la proteómica se inició por medio de la ESI-MS, siguiendo el protocolo denominado "bottom-up" (Tabla 2) [1, 15-16]. Cabe señalar que en la actualidad en el campo de la proteómica, además del protocolo "bottom-up" se usa el protocolo "top-down" efectuándose el análisis sobre la proteína intacta y su fragmentación sucesiva total dentro del espectrómetro de masa. Los estudios "top-down" se realizan sólo en equipos con ionización ESI del tipo ESI/FT-ICR con excitación por ECD y IRMPD y son clave para el estudio de modificaciones post-transduccionales (ver Tabla 2).

Tabla 2. Comparación del actual uso de ESI-MS y UV-MALDI-MS en el análisis de proteínas.

		Proteína degradada enzimáticamente			Proteína intacta y Modificaciones post-transduccionales		Complejo proteico
Método de ionización	Requerimiento de pureza del analito	Huella peptídica	LC/MS y 2D-LC/MS (ifenado)	Secuenciación "Bottom-up" ("Genoma" y "A novo")	PM	Secuenciación "Top-down" ^a	
UV-MALDI	-Proteína c/ o sin sales. -Mezclas de proteínas.	SI (sobre la mezcla)	NO	SI	SI	NO	NO
ESI	-Proteína pura.	SI (luego de LC ó 2D-GE)	SI	SI	SI	ESI/FT-ICR con excitación por ECD y IRMPD	SI

^a Ver detalles en ref. [19].

^b Ver detalles en ref. [19].

Equipos del tipo ESI-triple "cuadrupolo" (ESI-QqQ o ESI-QQQ o ESI-tripleQ) fueron de los primeros que permitieron hacer proteómica, con el protocolo "bottom-up".

La sensibilidad, resolución y exactitud de los ESI-MS varía según las marcas y los modelos. En la actualidad existen equipos más sofisticados donde al método de ionización ESI se lo combina con analizadores también únicos que permiten hacer los dos experimentos antes mencionados (sin fragmentación y con fragmentación). Estos analizadores son la denominada "trampa iónica" (IT) y el llamado "fourier transform-ion cyclotron resonance" (FT-ICR) y los equipos serían ESHT y ESI-FT-ICR [2,12,16]. La resolución, exactitud y sensibilidad son muy altas. También existen los equipos que tienen en un arreglo en "tandem" dos analizadores de iones diferentes y a los experimentos realizados se los denomina "espectrometría de masa tandem" (MS/MS o MS²). El equipo clásico es el denominado ESI-Q-TOF que combina un "cuadrupolo" (Q) y el analizador TOF de alta sensibilidad y también existe la combinación ESI-Q-IT [2].

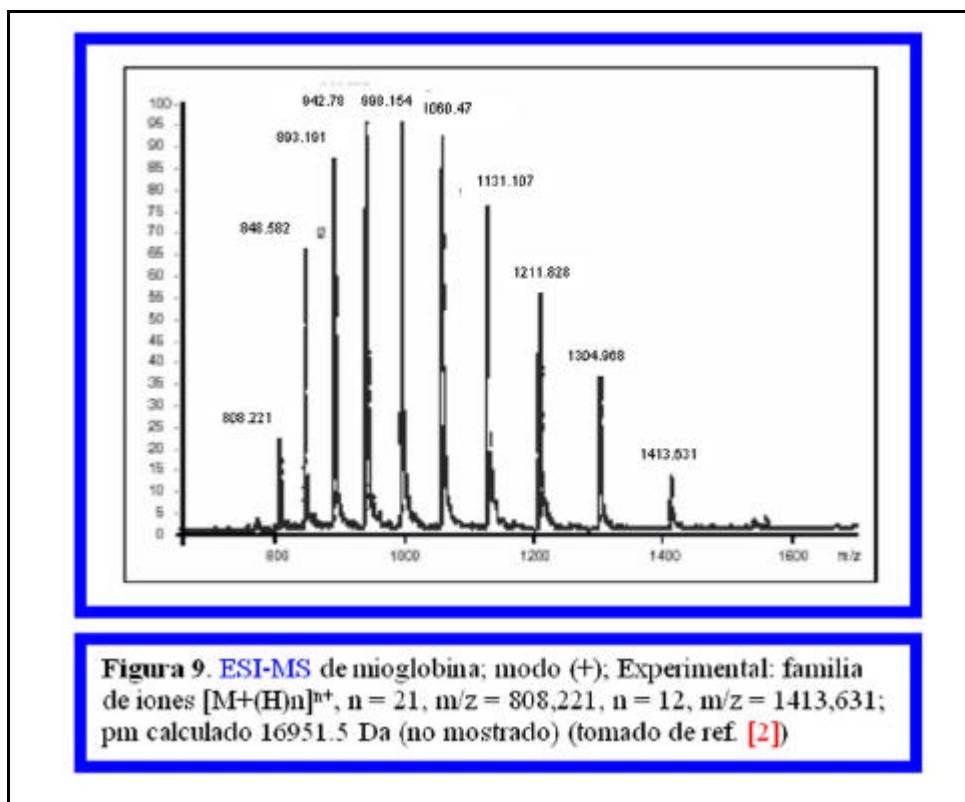
Existen también equipos que combinan el “analyzer de tiempo de vuelo” del tipo ESI-TOF, donde el espectrómetro de masa tiene solamente como analyzer un “tiempo-de-vuelo” (TOF) y los experimentos se realizan directamente en modo “reflectrón” (trayectoria de iones: V; mayor exactitud en m/z , [1]), siendo útiles estos equipos sólo para determinar el peso molecular (condiciones experimentales de no fragmentación), ya que no tienen la opción de trabajar en el modo de operación que se denomina PSD (“post source decomposition”, ver detalles en [1]). También los hay con la combinación Q-TOF con un analyzer TOF de mayor resolución, de doble reflejo (trayectoria de iones: N) y de triple reflejo (trayectoria de iones: W). En estos casos es posible efectuar estudios de secuenciación ya que el “cuadrupolo” (Q) filtra o selecciona al ion padre cuya fragmentación se va a analizar dentro de TOF.

Todas las combinaciones instrumentales anteriores admiten el uso tanto de ESI como de nano-ESI y, en ambas escalas de trabajo, de la variante Z-ESI (Figs. 7-8).

Todos estos equipos tienen aún en la actualidad la seria limitación de que el rango dinámico de operación está limitado por el “cuadrupolo” que como elemento de enfoque de iones forma parte de la unidad ESI (Fig. 6). Teóricamente este rango puede llegar a los 10000 Da. Sin embargo, en la mayoría de los equipos comerciales este rango tiene una cota superior de 4000 a 6000 Da (Tabla 1). Tener presente esta limitación instrumental es clave para entender que en un experimento ESI-MS, independientemente del analyzer de iones utilizado, la no obtención de señales simplemente puede deberse a que los iones formados tienen valores de m/z que caen fuera del rango dinámico del instrumento.

Cálculo de m y z . ¿Quién los efectúa? ¿Cuándo se efectúan?

Como ya se mencionó, el método de ionización ESI difiere de todos los demás [1] porque para un analito de peso molecular m , en lugar de detectarse una única señal a m/z con $z = 1$, se detecta una familia de señales con diferentes m/z siendo $z > 1$. Como se muestra en la Fig. 9 en el ESI-MS de la mioglobina, analizado en modo positivo, no se detecta el ión molecular monocargado a $m/z = 16951$ Da sino que se detecta una familia de señales con valores de m/z comprendidos entre 808,221 y 1413,631 Da. Estos son iones policargados por poliprotónación $[M(H)_n]^{n+}$, con valores de z comprendidos entre 21 y 12 ($m/21 = 808,221$ y $m/12 = 1413,631$ Da).



O sea que en realidad se obtiene una serie del tipo $[M+nH]n+$, $[M+(n+1)H](n+1)+$, $[M+(n+m)H](n+m)+$

Como se ve, se genera una serie de señales debidos a “quasi-iones moleculares” que difieren una de otra en un hidrógeno en su “quasi-peso molecular” m y en unidad de carga en su valor de z.

Si conocemos el valor de n, el problema está resuelto!

Afortunadamente estos cálculos se efectúan en forma automática durante el experimento, mediante programas de cálculo incluidos en el "soft" del equipo ESI-MS.

Básicamente los programas tienen en cuenta para un posible valor de M, y una dada combinación de átomos constituyentes de la molécula M, cuál es la relación teórica de intensidades para cada señal de los iones “cuasi-moleculares” teniendo en cuenta la abundancia isotópica natural de los elementos componentes. Para ese valor de M y esa combinación de átomo constituyentes trata de encontrar el valor de n que mejor calcula la distancia entre dos señales consecutivas.

Aquí aparece claramente cuan importante es conocer el grado de pureza del analito y de la solución para saber qué especie es la responsable de la carga de los iones “cuasi-moleculares”. El sistema de ecuaciones es diferente si la series incluye sólo al H+ ($[M+nH]n+$, $[M+(n+1)H](n+1)+$ $[M+(n+m)H](n+m)+$), o si incluye sólo al Na+ ($[M+nNa]n+$, $[M+(n+1)Na](n+1)+$ $[M+(n+m)Na](n+m)+$), o si incluye a ambos y más complicado es aún el sistema de ecuaciones si

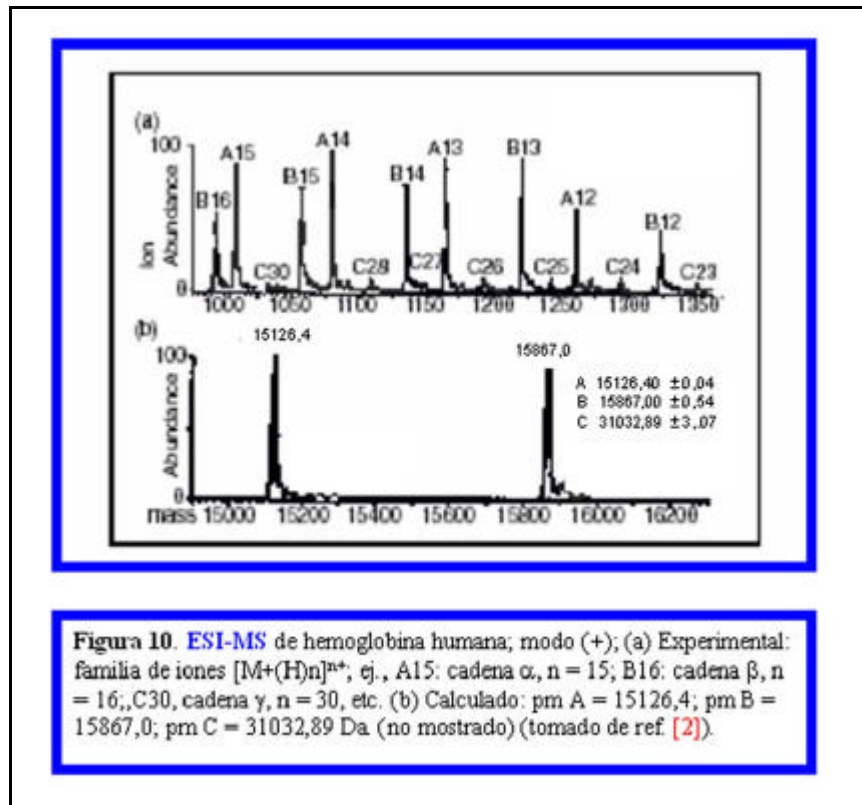
hay otros cationes en el medio. Esto es la denominada “baja tolerancia de sales” o “interferencia de sales” en la espectrometría de masa ESI (Tabla 1).

El programa efectúa en forma iterativa estos cálculos tantas veces como sea necesario hasta encontrar el valor óptimo de n . O sea aquél que daría por simulación un espectro ESI idéntico al obtenido experimentalmente. Y...de esta manera, “mágicamente” aparecen en pantalla los valores de z al lado de cada señal del espectro mientras se está efectuando el experimento.

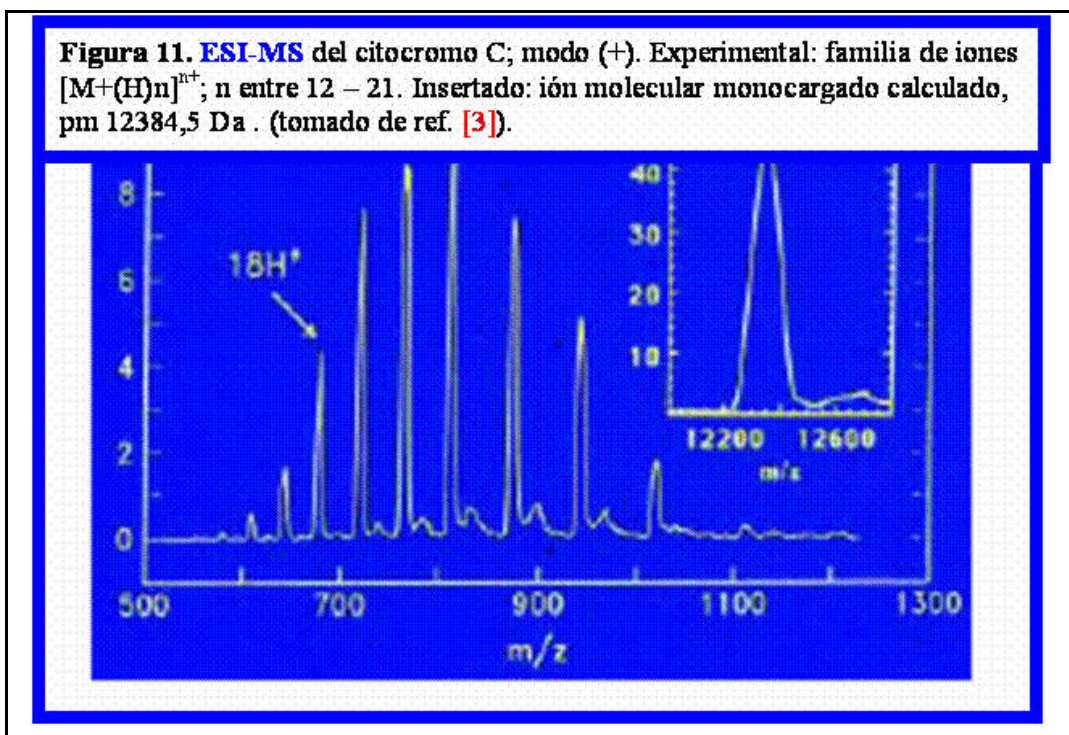
Sólo hay que darle al programa como información (i) el umbral de sensibilidad del experimento, (ii) quién es la especie responsable de la carga (H^+ y/o catión metálico) y (iii) cuáles serían los elementos constituyentes del analito, de manera de evitar que el programa “por default” considere todas las combinaciones posibles de la Tabla Periódica!

De esta manera se obtiene no solamente el valor de n sino además el valor del peso molecular del ión molecular intacto, M .

Como se muestra en la [Fig. 10](#) para la hemoglobina humana, el análisis por ESI-MS en modo positivo mostró la familia de iones policargados para cada una de las cadenas (A, alfa; B, beta; G, gama) indicando al lado de cada señal el valor de z calculado ((a) espectro obtenido experimentalmente). En la parte (b) se muestra la ubicación de los iones moleculares monocargados correspondientes a las cadenas A y B en el espectro simulado por el mismo programa de cálculo.



En la [Fig. 11](#) se muestra el primer ejemplo descrito por Fenn [3] de cálculo del peso del ión molecular monocargado de una proteína (citocromo C, pm 12384,5 Da, espectro insertado) cuyo espectro de masa ESI mostró, en modo positivo, la familia de iones policargados debido a poliprotónación, con m/z en el rango 600 – 1100 Da (z entre 12 – 21).

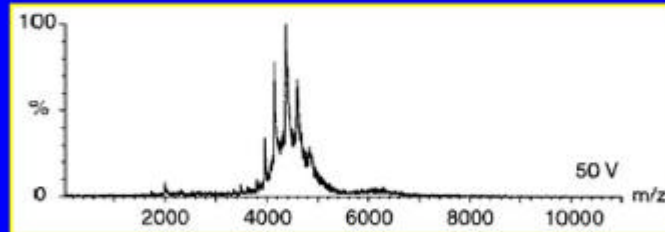


Para terminar ...complejos proteicos y polímeros sintéticos

Finalmente, para complementar en imágenes el panorama de aplicaciones actuales de la técnica ESI-MS [3,12-13,15-16], en las Figs 12-13 se muestran complejos proteicos en la primera [17] y polímeros sintéticos del tipo silsesquioxanos en la segunda [18]. En la Fig. 12 (imagen superior) se muestra, el espectro obtenido en modo positivo para el complejo proteico nativo de la chaperona MtGimC aislada y purificada y en la Fig. 12 (imagen inferior) los espectros obtenidos analizando sucesivamente alícuotas de una solución que ha sido preparada mezclando cantidades equimoleculares de las unidades proteicas alfa y beta que es sabido que forman el complejo proteico nativo [17]. Esta interesante aplicación se basa en la ya mencionada particularidad de la ESI que es la de mantener entre las unidades proteicas gaseosas policargadas las mismas interacciones intermoleculares que están presentes en la solución. Por supuesto que esto es válido no sólo para proteínas, sino para analitos en general.

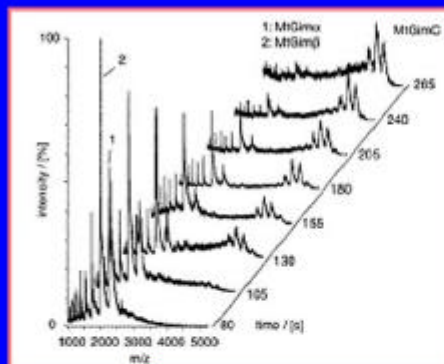
MtGimC purificada. ESI-MS en modo positivo:

Picos de diferentes cargas (z) que corresponde al PM del hexámero. Consistente con rearrreglo $\alpha_2\beta_4$.



Observación en tiempo real del ensamblado de MtGimC

Mezcla en solución de las subunidades aisladas (relación α/β 1:2). Se realizan espectros ESI a diferentes tiempos. Tiempo muerto: 30 seg



265 s Todo MtGimC

205 s Predomina MtGimC

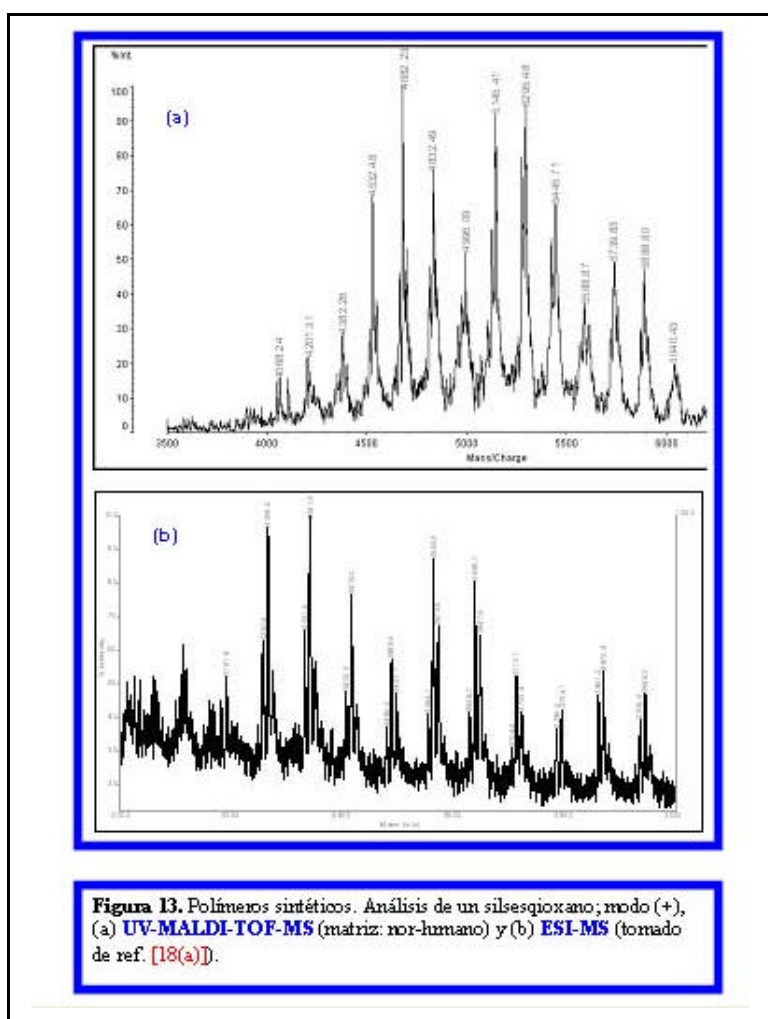
130 s Compuestos de mayor m/z (PM de MtGimC)

20 s Principalmente α y β (también α_2)

La formación de MtGimC no procede mediante la formación de intermediarios estables detectables (o bien éstos se convierten rápidamente en hexámeros)

Figura 12. ESI-MS de complejos proteicos; modo (+). (a) Chaperona MtGimC nativa; (b) cinética de su formación en solución a partir de las subunidades α y β (tomado de ref. [17]).

En cuanto a sus aplicaciones a polímeros sintéticos, en la [Fig 13](#) se muestran los espectros de masa UV-MALDI-TOF y ESI obtenidos en modo positivo para un polímero sintético. Este contiene en su estructura Si (silsesquioxanos) y del espectro UV-MALDI ([Fig. 13\(a\)](#)), se concluye que su peso molecular promedio es del orden de 5000 Da, coincidiendo este valor con el obtenido por SEC (cromatografía de exclusión por tamaño, [18a]). En el mismo espectro se observa la distribución gaussiana esperada de los oligómeros constituyentes (información cuantitativa). Por el contrario, el espectro ESI ([Fig. 13\(b\)](#)) muestra a primera vista un aspecto totalmente diferente. No solamente las señales aparecen a valores de m/z menores debido a la policarga (ESI, m/z entre 2200 – 3000 Da; UV-MALDI, m/z entre 4000 – 6500 Da) sino que, además, se pierde la imagen de distribución gaussiana de los oligómeros debido al entrecruzamiento de señales de los diferentes oligómeros policargados. Con este último ejemplo se muestra claramente que en el análisis de mezclas en general, sean o no éstas oligómeros de polímeros naturales o sintéticos, se requiere para la interpretación de la información obtenida por ESI-MS disponer de los espectros obtenidos por UV-MALDI-MS.



Referencias

- [1] Erra-Balsells, R., abril 2004. Del vuelo de las proteínas y de cómo lograrlo (espectrometría de masa UV-MALDI). *Química Viva*, 3(2).
- [2] Back to Basics Manual, Micromass UK Limited, www.micromass.co.uk
- [3] Fenn, J. B., Electrospray Wings for Molecular Elephants, Nobel Lecture, <http://www.nobel.se>
- [4] Bothner, B., Dong, X. F., Bibbs, L., Johnson, J. E. and Siuzdak, G., 1998. Evidence of viral capsid dynamics using limited proteolysis and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 273, 673-676.
- [5] Dole, M., Mach, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D. and Alice, M. B., 1968. Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* 49, 2240-2247.
- [6] Mann, M., Meng, K. C. and Fenn, J. B., 1988. Proc. Proceedings of the 36th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Am. Soc. For Mass Spectrom., San Francisco CA, p. 773, 1207-1208.
- [7] Yamashita, M. and Fenn, J. B., 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88, 4451-4469.
- [8] Aleksandrov, M. L., Gall, L. N., Krasnov, V. N., Nikolaev, V. I., Pavlenko, V. A. and Shkurov, V. A. 1984. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 277, 379-383.
- [9] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M., 1989. Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules. *Sciences* 246, 64.
- [10] Wilm, M., Shevchenko, A., Houtaev, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T and Mann, M. 1996. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379, 466-469.
- [11] Valaskovic, G.A. and McLafferty, F. W. 1995. Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry. *Anal. Chem.* 67, 3802-3805.
- [12] Cole, R. B. 1997. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation, and Applications*, John Wiley and Sons, INC., NY.
- [13] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M., 1990. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrom. Rev.* 9, 37-70.
- [14] Smith, R. D., Loo, J. A., Edmonds, C. G., Barinaga, C. J. and Udseth, H. R., 1990. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal. Chem.*, 62, 882-889.
- [15] (a) Liebler, D. C. 2002, *Introduction to Proteomics- Tools for the New Biology*, Human Press, Totowa, NJ;
- (b) Mann, M. and Jensen, O. N., 2003. *Proteomic analysis of post-translational modifications* (www.nature.com/naturebiotechnology) Vol 21.
- [16] Siuzdak, G., 1996. *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Academic Press.
- [17] Fanderich, M., Tito, M. A., Leroux, M. R., Rostom, A. A., Ulrich Hartl, F., Dobson, C. M. and Robinson, C. V., 2000. Observation of the noncovalent assembly and disassembly pathways of the chaperone complex MtGimC by mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14151-14155.
- [18] (a) Fasce, D. P., Williams, R. J. J., Erra-Balsells, R., Ishikawa, Y. and Nonami, H., 2001. One-Step Synthesis of Polyhedral Silesquioxanes Bearing Bulky Substituents: UV-MALDI-TOF and ESI-TOF Mass Spectrometry Characterization of Reaction Products. *Macromolecules* 34, 3534-3539;
- (b) Williams, R. J. J., Erra-Balsells, R., Ishikawa, Y., Nonami, H., Mauri, A. N. and Riccardi, C. C., 2001. UV-MALDI-TOF and ESI-TOF mass spectrometry characterization of silesquioxanes obtained by the hydrolytic condensation of (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane. *Macromol. Chem. Phys.* 202, 2425-2433;

(c) Montaudo, M. S., 2002. Mass Spectra of Copolymers. *Mass Spectrom. Rev.* 21, 108-144.

[19] (a) Kelleher, N L., Lin, H. Y., Valaskovic, G. A., Aaserud, D. J., Fridriksson, E. K., McLafferty, F. W., 1999. Top down versus Bottom up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 806-812;

(b) Oh, H. B., Breuker, K., Sze, S. K., Ge, Y., Carpenter, B. K. and McLafferty, F. W., 2002. Secondary and Tertiary Structures of Gaseous Protein Ions Characterized by Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry and Photofragment Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15863-15868;

(c) Breuker, K. and McLafferty, F. W., 2003. Native Electron Capture Dissociation for Structural Characterization of Noncovalent Interactions in Native Cytochrome c. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 4900-4904;

(d) Patrie, S. M., Charlebois, J. P., Whipple, D., Kelleher, N. L., Hendrickson, C. L., Quinn, J. P., Marshall, A. G., Mukhopadhyay, B., 2004. Construction of a Hybrid Quadrupole/Fourier transform ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer for Versatile MS/MS Above 10 kDa. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15, 1099-1108.

*Dra. Rosa Erra-Balsells. E-mail: erra@qo.fcen.uba.ar

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**
Número 3, año 3, septiembre 2004
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Bioplásticos: una alternativa ecológica.

Alejandra de Almeida, Jimena A. Ruiz, Nancy I. López y M. Julia Pettinari*

Laboratorio de Ecología y Genética Bacteriana, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Recibido 13 de julio de 2004
Aceptado 20 de agosto de 2004

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHA) son sintetizados por muchas especies de distintos géneros bacterianos en condiciones de crecimiento caracterizadas por exceso en la fuente carbonada y limitación de otros nutrientes como nitrógeno o fósforo. Estos polímeros se acumulan en gránulos intracitoplasmáticos y son utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez nutricional. Resultados obtenidos en el laboratorio nos permitieron demostrar que la degradación de PHA cumple un papel muy importante en la supervivencia bacteriana y en los mecanismos de resistencia al estrés, en condiciones de baja concentración de nutrientes.

A su vez, estos biopolímeros son termoplásticos y poseen propiedades similares a las de los plásticos derivados del petróleo. Pueden ser totalmente degradados por las bacterias que los producen, y por otras bacterias, hongos y algas. A pesar de las evidentes ventajas de los PHA frente a los plásticos derivados del petróleo, su uso está muy limitado debido a su alto costo de producción. Por este motivo, gran parte de las investigaciones realizadas sobre los PHA en los últimos años se han concentrado en reducir los costos de producción y aumentar la productividad utilizando diversas estrategias. Entre ellas se encuentran el rastreo de nuevas cepas productoras, la optimización de las estrategias de cultivo y la producción de PHA utilizando cepas de *E. coli* recombinantes. Todas ellas se están llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio.

Palabras clave: polihidroxicanoatos, bioplásticos, bacterias, estrés, supervivencia.

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are synthesized by many species of bacteria belonging to different genera, in growth conditions characterized by an excess of carbon source and a limitation in other nutrients such as nitrogen or phosphorus. These polymers are accumulated in intracytoplasmatic granules, and are used as a source of carbon and energy when nutrients are scarce. Results obtained in our laboratory allowed us to demonstrate that PHA play a very important role in bacterial survival and in stress resistance mechanisms in poor nutrient conditions.

These biopolymers are thermoplastics and their properties are similar to those of petroleum-derived plastics. They can be completely degraded by bacteria that produce them, and also by other bacteria, fungi and algae. In spite of the obvious advantages that PHA compared with petroleum-derived plastics, their use is currently limited due to their high production costs. For this reason, most research done on PHA in the last years is focused on reducing production costs and increasing productivity by means of several strategies. Among these strategies are screening for new PHA-producing strains, the optimization of fermentation conditions and the production of PHA using recombinant *E. coli* strains, all of which are currently being studied in our laboratory.

Key words: polyhydroxyalkanoates, biopolymers, bacteria, stress, survival.

Introducción

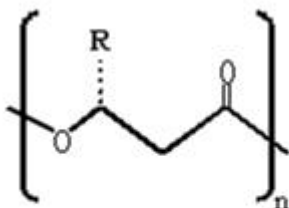


Figura 1. Estructura general de los polihidroxicanoatos

Los PHA son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (**Figura 1**).

Los PHA se depositan intracelularmente en formas de cuerpos de inclusión y pueden llegar a representar más del 90% del peso seco celular (**Fig 2**).

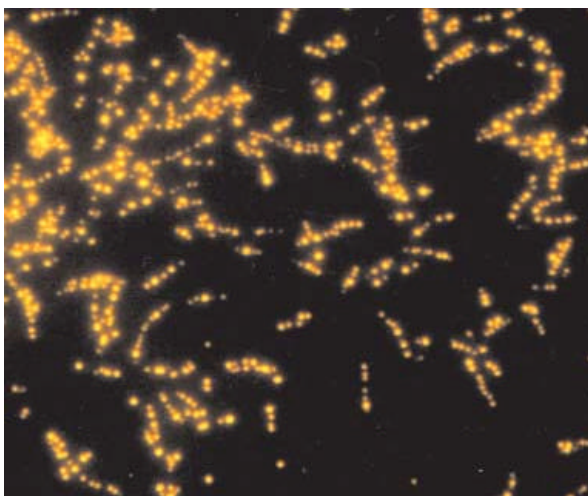


Figura 2. Células de *P. putida* GPO1 con gránulos de PHA . Fotografía de una microscopía de fluorescencia. Los extendidos de células se muestran teñidos con un colorante específico para PHA que fluoresce de color naranja brillante a una longitud de onda de 460 nm.

El primer PHA descubierto fue el poli(3-D-hidroxi butirato) (PHB), un homopolímero que fue detectado en la especie *Bacillus megaterium* en el año 1925 (7). Posteriormente, se encontraron inclusiones de PHA en una extensa variedad de especies bacterianas. La progresiva acumulación de los desechos sólidos, a medida que aumenta la industrialización y el consumo, es un problema global que comenzó a advertirse en el siglo pasado y se hace cada vez más angustiante. Uno de los materiales de desecho más persistentes son los plásticos, que permanecen en la superficie terrestre prácticamente inalterables por miles de años.

Los PHA han cobrado una gran importancia durante los últimos años en el campo de la industria debido a sus propiedades termoplásticas. Por este motivo, han sido considerados como posibles sustitutos de los plásticos derivados del petróleo.

Además de sus propiedades termoplásticas, los PHA poseen otras características interesantes: su biodegradabilidad y el hecho de que pueden ser producidos a partir de recursos renovables. Su producción fermentativa utiliza productos derivados de la agricultura como fuente de carbono. En la naturaleza los microorganismos son capaces de degradar los PHA, mediante la acción

de PHA depolimerasas y PHA hidrolasas extracelulares, hasta CO₂ y agua. De esta manera, mientras que los plásticos derivados de hidrocarburos utilizan las escasas reservas petroquímicas del planeta, la producción de PHA se basa en la utilización de recursos renovables.

Ante estas ventajas tan evidentes, ¿por qué no utilizar los PHA en lugar de los plásticos tradicionales? La respuesta es muy simple: su costo es varias veces mayor.

En los años 70 hubo una crisis mundial de petróleo, en la que el precio del combustible fósil creció mucho. En ese contexto, las investigaciones alrededor de los PHA florecieron, y la empresa ICI desarrolló un proceso para producir a escala industrial un bioplástico que se comercializó bajo el nombre de "Biopol". Este polihidroxicanoato es un copolímero de monómeros de cuatro y cinco carbonos, denominados hidroxibutirato e hidroxivalerato, respectivamente. El "Biopol" se producía utilizando la bacteria *Ralstonia eutropha* cultivada en un medio con glucosa y propionato como fuentes de carbono. A pesar de su costo relativamente elevado, el "Biopol" fue utilizado en varias aplicaciones en algunos países como Alemania.

A fines del siglo XX el precio del petróleo disminuyó, y de la misma manera decayó el interés por los PHA. En los últimos años esta tendencia se ha revertido. Además de producirse un aumento en el precio del petróleo, se ha tomado mayor conciencia de que las reservas se están agotando de manera alarmante. Las estimaciones varían mucho, ya que la información que suministran los países que tienen reservas de petróleo no siempre es confiable, pero lo más probable es que comiencen a agotarse en las próximas décadas. Ante esta perspectiva, las investigaciones que involucran a los plásticos obtenidos de otras fuentes han tomado un nuevo impulso, y los polihidroxicanoatos aparecen como una alternativa altamente prometedora.

Por otro lado, los residuos plásticos se acumulan en grandes cantidades y su degradación es lenta. En un estudio reciente publicado en la revista "Science" se observó que hay partículas de plástico presentes en los mares de todo el mundo (24). El reciclado de los plásticos aliviaría un poco la situación, pero sólo en parte. Por este motivo, el reemplazo de los plásticos no degradables por biopolímeros totalmente degradables obtenidos a partir de fuentes de carbono renovables sería una solución mucho más completa para los diferentes aspectos de este problema. Sin embargo, el precio de los bioplásticos sigue siendo demasiado alto como para que puedan desplazar a los plásticos tradicionales. Debido a esto, es necesario diseñar estrategias para obtener polihidroxicanoatos a un costo similar.

El precio final de los biopolímeros depende de varios factores, entre ellos los costos de la producción, el rendimiento de polímero obtenido y los costos de procesamiento. Existen actualmente varios enfoques para lograr producir PHA a precios competitivos.

Producción de PHA en plantas

Las plantas serían la alternativa ideal para la producción de biopolímeros, debido a la posibilidad de cultivarlas en grandes cantidades utilizando la fuente de energía más económica que existe: la luz solar. Se han logrado introducir y expresar los genes bacterianos necesarios para la síntesis de PHA en plantas de cultivo (18), lográndose obtener pequeñas cantidades de polímero.

Sin embargo, para poder utilizar plantas para la producción de PHA es necesario solucionar una serie de problemas. Por ejemplo, el metabolismo vegetal está altamente compartimentalizado, lo cual complica la tarea, ya que es necesario que los genes *pha* se expresen en el compartimiento celular que contiene la mayor concentración de acetil-CoA, y al mismo tiempo impedir que se vea afectado el crecimiento de la planta (10).

Producción de PHA en microorganismos

Para poder desarrollar un proceso de producción de PHAs mediante fermentación utilizando microorganismos es necesario optimizar el rendimiento y la facilidad de purificación del polímero, y fundamentalmente abaratar el costo de los sustratos utilizados para su obtención.

Los primeros procesos desarrollados para la producción de PHA en microorganismos se realizaron mediante fermentación utilizando a la bacteria *Ralstonia eutropha*, la cual es capaz de producir PHB a partir de glucosa, o polihidroxibutirato-valerato (PHBV) a partir de glucosa y propionato, sustratos cuyo alto costo incidía en el precio final del polímero obtenido.

Actualmente, existen varios procesos desarrollados para la producción de PHA por fermentación a partir de sustratos económicos: en Brasil se producen a partir de melaza de caña, y en Estados Unidos y Corea a partir de varios sustratos de origen vegetal.

Importancia de los PHA en la supervivencia bacteriana

La gran mayoría de los seres vivos acumulan diferentes sustancias de reserva cuando existe un exceso de recursos en su entorno. Cuando los nutrientes se vuelven escasos, son utilizadas para poder sobrevivir.

Entre las sustancias de reserva acumuladas por los organismos procariontes se encuentran los polihidroxicanoatos (PHA). Estos polímeros son acumulados en gránulos intracelulares por numerosas especies de bacterias, en condiciones limitantes de nutrientes esenciales para el crecimiento (tales como nitrógeno combinado, azufre o fosfatos) y exceso en la fuente de carbono (23). Cuando la fuente de carbono externa se agota, o si el nutriente limitante es suministrado nuevamente, el PHA es depolimerizado y posteriormente metabolizado como fuente de carbono y energía (12).

La utilización de dicho polímero es considerada una estrategia desarrollada por las bacterias para incrementar su supervivencia en ambientes cambiantes. Los PHA son utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes (11), como fuente de carbono y energía para el enquistamiento y la esporulación (1), para la degradación de compuestos tóxicos (4), y como fuente de poder reductor (5).

Las investigaciones realizadas sobre los PHA en los últimos años apuntan a reducir los costos de producción y aumentar la productividad utilizando diversas estrategias. Para lograr estos objetivos es fundamental optimizar el proceso de fermentación. Trabajos recientes han demostrado la importancia del estudio de la respuesta general a estrés para el desarrollo de estos procesos (3, 13), señalando la necesidad de realizar tanto estudios básicos como aplicados para el diseño de procesos biotecnológicos que involucran pasos de fermentación.

En nuestro laboratorio se llevan a cabo estudios orientados hacia estos objetivos, que incluyen el rastreo de nuevas cepas productoras, la optimización de las estrategias de cultivo y la producción de PHA utilizando cepas de *E. coli* recombinantes. Por otra parte, se realizan investigaciones relacionadas con la importancia del polímero en la supervivencia bacteriana y en los mecanismos de respuesta a estrés. Parte de estos estudios se presentan a continuación.

Resultados y Discusión

Síntesis de PHA en *Azotobacter* sp. FA8

Azotobacter sp. FA8 es una bacteria productora de PHB aislada de muestras de suelo. Esta cepa puede utilizar sacarosa o melazas de caña, un subproducto de la obtención de azúcar de caña muy barato en nuestro país y en los diferentes países de la región, para producir PHB. Otra característica importante de este microorganismo es que no forma cápsula, lo cual significa que no deriva la fuente carbonada para la síntesis de exopolisacáridos.

En esta bacteria el polímero se sintetiza mediante un camino metabólico que involucra tres enzimas: una β -cetotilasa, que condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, una acetoacetil-CoA reductasa, que convierte este compuesto en 3-hidroxiacetil-CoA, y una polimerasa, que polimeriza los monómeros. Este camino metabólico es el que utilizan la mayoría de las bacterias productoras de PHB, tales como *R. eutropha*. En *Azotobacter* sp. FA8 estas enzimas están codificadas por los genes *phaB*, *phaA* y *phaC*, que han sido clonados y caracterizados en nuestro laboratorio (16).

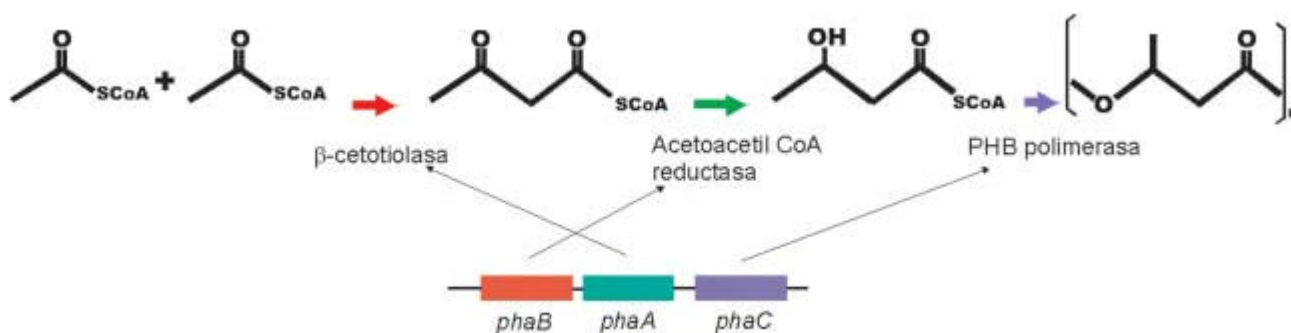


Figura 3. Esquema de la síntesis de PHB en *Azotobacter* sp. FA8.

Existen otras proteínas involucradas en la regulación de la biosíntesis del polímero y en la formación de los gránulos intracitoplasmáticos. Se han descrito varias proteínas estructurales. Una de ellas son las fasinias, que se encuentran asociadas a los gránulos de PHA. Estas proteínas podrían afectar el tamaño y la pureza de los gránulos, ya que son importantes para la forma que el gránulo adquiere intracelularmente e impiden que otras proteínas puedan asociarse inespecíficamente, lo cual simplifica la purificación del polímero. La interacción entre las proteínas asociadas a los gránulos es prácticamente desconocida en todas las especies estudiadas hasta ahora. Sin embargo, es probable que las proteínas no catalíticas interactúen con las proteínas enzimáticamente activas, como las sintetas y las depolimerasas, afectando la velocidad de producción de PHA.

Además de los genes estructurales, *phaB*, *phaA* y *phaC*, en la misma región del genoma de *Azotobacter* sp. FA8 se han encontrado otros genes asociados al metabolismo de los PHA. Entre ellos se encuentran, el gen *phaP*, el cual codifica para una proteína asociada a los gránulos de PHA, y los genes *phaF* y *phaR*, que poseen una posible función regulatoria de la síntesis y acumulación de PHA y son homólogos a genes involucrados en la producción de PHA en otros microorganismos (17). Por otro lado, también se ha identificado una secuencia de inserción completa (ISAzspI) y los restos de otra (ISR), situadas a ambos lados del grupo formado por los genes *phaF*, *phaP* y *phaR*. Esto sugiere la posibilidad de que estos genes hayan sido transferidos a *Azotobacter* a partir de otro microorganismo mediante un mecanismo que involucra secuencias de inserción, similar al observado en la transferencia de islas de patogenicidad.

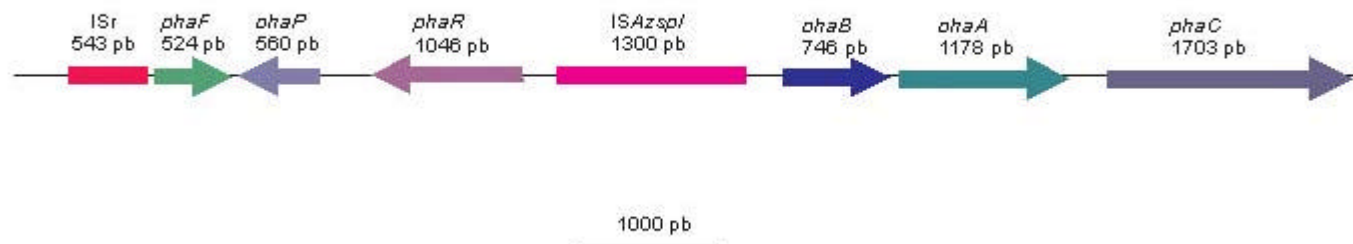


Figura 4. Organización genética de la región *pha* de *Azotobacter* sp. FA8. Las flechas indican el sentido de la transcripción. La barra representa una longitud de 1000 pares de bases (pb).

Producción de PHA en *Escherichia coli* recombinante

Los productores naturales de PHA, como *Azotobacter* sp. FA8, se han adaptado a la acumulación de estos polímeros durante la evolución, pero normalmente tienen un tiempo de generación largo y temperaturas de crecimiento relativamente bajas. Además, son difíciles de lisar y poseen enzimas que degradan el polímero acumulado. Estas características dificultan su uso en la producción industrial de los biopolímeros.

Entre las cepas bacterianas comúnmente utilizadas en procesos biotecnológicos, *E. coli* es el microorganismo mejor conocido, ya que su metabolismo ha sido extensivamente estudiado y caracterizado. Debido a esto, es un microorganismo modelo, ideal para su uso en fermentaciones. Además, debido al gran número de herramientas disponibles para realizar manipulaciones genéticas, es el organismo adecuado para realizar ensayos previos al traspaso de los genes a plantas. *E. coli* no posee la capacidad de sintetizar o degradar PHA pero crece rápido y es fácil de lisar. Se han expresado los genes *pha* de varias especies bacterianas en *E. coli*, obteniéndose buenos rendimientos del polímero. Asimismo, al no poseer enzimas que degraden a los PHA, permite la acumulación de polímero de alto peso molecular.

Los genes necesarios para la síntesis de PHB de *Azotobacter* sp. FA8, *phaB*, *phaA* y *phaC*, han sido clonados y caracterizados en el laboratorio y transferidos a una cepa de *E. coli* adecuada para la producción del polímero.

Para lograr una buena acumulación del polímero en *E. coli* recombinante es necesario utilizar vectores de expresión estables con un alto número de copias, pues uno de los mayores desafíos del sistema es la expresión estable y sostenida de los genes *pha*. Para esto, se construyó un plásmido recombinante introduciendo los genes *pha* de *Azotobacter* sp FA8 bajo la regulación del promotor lactosa en un vector de expresión de alto número de copias. Este plásmido se transfirió a *E. coli* y permitió la

obtención de PHB en la cepa recombinante a partir de glucosa. La cepa utilizada también degrada lactosa, por lo que se analizó la producción del polímero utilizando lactosa y también lactosuero en un medio salino, obteniéndose una buena cantidad de polímero en ambos casos. En este momento se están realizando las pruebas piloto para aumentar la escala del proceso, con el objeto de desarrollar un proceso económicamente atractivo de producción del polímero, ya que el medio de cultivo utilizado solamente contiene sales y lactosuero, un desecho de la industria lechera, como fuente de carbono. La utilización del lactosuero tiene una ventaja adicional, ya que se trata de un desecho contaminante cuya eliminación adecuada involucra un costo elevado. Su utilización como sustrato de una fermentación cuyo producto es una sustancia con un buen valor económico implica entonces un doble beneficio.



Figura 5. Trozos de polihidroxibutirato (PHB) extraído de cultivos bacterianos. . izq) *Azotobacter* sp FA8 crecida en medio mínimo con 3% de glucosa der) *E. coli* recombinante (contiene los genes estructurales *pha* de *Azotobacter* sp. FA8) crecida en medio mínimo con 2,5 % de lactosa

Papel de los PHA en la supervivencia y en la resistencia a factores de estrés

Trabajos realizados en el laboratorio con cepas salvajes y deficientes en la síntesis de PHB de *Ralstonia eutropha* y *Bacillus megaterium*, demostraron que aquellas cepas capaces de sintetizar el polímero de reserva tenían mayor supervivencia en agua de río y mayor capacidad de competencia con las bacterias autóctonas, que sus correspondientes mutantes (8). Conclusiones similares se obtuvieron cuando se analizó la supervivencia de *B. megaterium* utilizando microcosmos de suelo (9). Estos experimentos sugirieron que la síntesis y utilización del polímero aumentaba la supervivencia y la capacidad de competencia bacteriana en ambientes naturales. A partir de estos resultados, se decidió analizar el efecto de la degradación de PHA en la supervivencia. Para esto, se comparó la supervivencia en agua de río de una cepa salvaje de *Pseudomonas putida*, con la supervivencia de una cepa mutante en la enzima PHA depolimerasa. Los resultados obtenidos con estas cepas demostraron que la incapacidad de degradación de PHA representaba una desventaja para la supervivencia, tanto en agua de río estéril, como en agua de río con la comunidad bacteriana natural (19). Además se comprobó que la deficiencia en la capacidad de degradación de PHA, tenía un

efecto negativo sobre el desarrollo de resistencia al estrés. Se observó que la mutante deficiente en la depolimerasa de PHA mostraba una menor supervivencia a la exposición al etanol y al estrés térmico luego de varios días de permanencia en agua de río. Dado que, tanto la entrada en la fase estacionaria como las condiciones de deficiencias nutricionales encontradas en el ambiente confieren resistencia a múltiples agentes de estrés, los resultados obtenidos con las cepas de *P. putida* indicaban que existiría una alteración en la respuesta al estrés ante la incapacidad de utilizar PHA.

Relación entre la degradación de los PHA y los mecanismos de respuesta al estrés

Los resultados descritos anteriormente demuestran que los PHA juegan un papel importante en la supervivencia bacteriana ante condiciones de estrés. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos mediante los cuales la utilización de PHA favorece la supervivencia bacteriana en condiciones desfavorables. En un trabajo realizado con *R. eutropha* en 1967, se sugirió que existía una asociación entre la utilización de los PHA y la fosforilación oxidativa (6).

Se sabe que, ante condiciones adversas, las bacterias son capaces de responder con diversos mecanismos de control activos que les permiten hacer frente a dichas condiciones. Uno de estos mecanismos es la **respuesta general a estrés** que se induce en bacterias Gram-negativas ante distintas condiciones de estrés ambiental, tales como escasez en nutrientes, estrés osmótico, estrés oxidativo y cambios bruscos de temperatura. Los genes involucrados en la resistencia al estrés se encuentran bajo el control de una subunidad sigma alternativa de la RNA polimerasa denominada σ^S , codificada por el gen *rpoS*.

Otra respuesta desencadenada ante condiciones de estrés es la **respuesta estricta**, que se caracteriza por un aumento en el nivel intracelular de la molécula tetrafosfato de guanósina [ppGpp]. Dicha molécula modula la expresión de varios genes, entre ellos el *rpoS*.

Teniendo en cuenta que la degradación de PHA favorece la supervivencia y la resistencia a estrés de las bacterias en condiciones de escasez nutricional, en el laboratorio decidimos analizar si la degradación de PHA tenía algún efecto sobre los mecanismos de respuesta al estrés en la bacteria *P. putida*. Para esto se utilizó una cepa salvaje y una cepa con una mutación en la enzima PhaZ, encargada de degradar PHA, y se analizó el contenido intracelular de ppGpp en condiciones de depolimerización de PHA, así como también la resistencia a estrés térmico y oxidativo, y el contenido intracelular de σ^S durante ayuno de carbono.

Los resultados obtenidos mostraron que la degradación de PHA se encontraba relacionada con un aumento intracelular en el nivel de ppGpp (20), y que a su vez, la capacidad de degradación del polímero incrementaba el nivel intracelular de σ^S y la resistencia a estrés térmico y oxidativo

durante ayuno de carbono (21). Estos resultados sugirieron que existe una relación entre la depolimerización de PHA y la respuesta general a estrés controlada por RpoS, que tal vez se encuentre mediada por ppGpp.

Dado que el polihidroxicanoato es un reservorio de carbono, energía y equivalentes de reducción, tanto su síntesis como su degradación tienen un efecto importante sobre el metabolismo central de la célula procariota. Los resultados obtenidos en el laboratorio demuestran la influencia del PHA en los complejos mecanismos regulatorios involucrados en la respuesta al estrés, y abren el camino para investigar la conexión entre los factores que regulan la degradación de PHA y las redes regulatorias globales de adaptabilidad bacteriana al ambiente.

Materiales y Métodos

Condiciones de cultivo y determinación de PHA:

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: para *Pseudomonas putida* medio E (25), para *Escherichia coli* recombinantes medio M9 (con glucosa, lactosa o lactosuero) (22) y para *Azotobacter* sp. FA8 medio de Burk (15). La acumulación de PHA se determinó cualitativamente mediante tinción con azul de Nilo (14) y cuantitativamente por cromatografía gaseosa (2).

Experimentos de supervivencia y resistencia a estrés:

Se analizaron cultivos en distintas condiciones de crecimiento y acumulación de PHA. La concentración o dosis de los agentes estresantes se determinó de manera de lograr la rápida disminución de la sobrevivencia en cultivos en condiciones de crecimiento exponencial. Se ajustaron las condiciones del experimento (tiempo de exposición, medio de cultivo, fase de crecimiento, número de bacterias/ml) y a diferentes intervalos de tiempo, luego de la exposición al agente de estrés, se cuantificó el número de bacterias mediante recuento en placas de agar nutritivo.

Manipulaciones genéticas

El clonado de los genes *pha* de *Azotobacter* sp. FA8 se realizó mediante la construcción de una biblioteca genómica (16), utilizando el cósmido pVK102 como vector y un *kit* de empaquetado de fago lambda para transducción. Los genes *pha* se identificaron por complementación de *Ralstonia eutropha* PHA-4 y por hibridación mediante sondas heterólogas utilizando reactivos luminiscentes. Los subclones obtenidos se secuenciaron por *primer walking* mediante un servicio de secuenciación. Para la purificación de plásmidos y fragmentos de DNA se recurrió a *kits* comerciales. Como vector de subclonado se utilizó el plásmido pBluescriptSK-, o el pGEMT-Easy en el caso de fragmentos de amplificación.

Referencias

1. Anderson, A. J., and E. A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial use of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450-472.
2. Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller, C. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly- β -hydroxyalkanoate for potential applications biodegradable polyesters. *Appl Environ Microbiol* 54: 1977-1982
3. Cserjan-Puschmann, M., Kramer, W., Duerrschmid, E., Striedner, G. y Bayer, K. 1999. Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 43-50
4. Godoy, F. A., M. Bunster, V. Matus, C. Aranda, B. Gonzalez, and M. A. Martinez. 2003. Poly- β -hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. *Lett Appl Microbiol* 36:315-20.
5. Henrysson, T., and P. L. McCarty. 1993. Influence of the endogenous storage lipid poly- β -hydroxybutyrate on the reducing power availability during cometabolism of trichloroethylene and naphthalene by resting methanotrophic mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1602-1606.
6. Hippe, H. 1967. Abbau und Wiederverwertung von Poly- β -hydroxybuttersäure durch *Hydrogenomonas* H16. *Arch. Mikrobiol.* 56:248-277.
7. Lemoigne, M. 1926. Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8:770-782.
8. López, N. I., M. E. Floccari, S. A., A. F. García, and M. B. S. 1995. Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 16:95-112.
9. López, N. I., Ruiz, J. A. y Méndez, B. S. 1998. Survival of poly-3-hydroxybutyrate-producing bacteria in soil microcosms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:681-684.
10. Madison, L. L., and G. W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:21-53.
11. Matin, A., C. Veldhuis, V. Stegeman, and M. Veenhuis. 1979. Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly- β -hydroxybutyric acid and its role in starvation. *J. Gen. Microbiol.* 112:349-355.
12. Merrick, J. M., and M. Doudoroff. 1964. Depolymerization of poly- β -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.* 88:60-71.
13. Notley-McRobb, L.; King, T. y Ferenci, T. 2002. rpoS Mutations and Loss of General Stress Resistance in *Escherichia coli* Populations as a Consequence of Conflict between Competing Stress Responses. *J. Bacteriol.* 184: 806-811.
14. Ostle A, Holt GJ. 1982 Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* 44: 238-241
15. Page, W.J., Manchak, J., Rudy, B. 1992. Formation of poly(hydroxybutyrate-Co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2866-2873
16. Pettinari, M. J., G. J. Vazquez, D. Silberschmidt, B. Rehm, A. Steinbuchel, and B. S. Mendez. 2001. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. *Appl Environ Microbiol* 67:5331-4.
17. Pettinari, J. M., L. Chaneton, G. Vazquez, A. Steinbuchel, and B. S. Mendez. 2003. Insertion sequence-like elements associated with putative polyhydroxybutyrate regulatory genes in *Azotobacter* sp. FA8. *Plasmid* 50:36-44.
18. Poirier, Y., C. Somerville, L. A. Schechtman, M. M. Satkowski, and I. Noda. 1995. Synthesis of high-molecular-weight poly([R]-(-)-3-hydroxybutyrate) in transgenic *Arabidopsis thaliana* plant cells. *Int J Biol Macromol* 17:7-12.
19. Ruiz, J. A., N. I. Lopez, and B. S. Mendez. 1999. Polyhydroxyalkanoates degradation affects survival of *Pseudomonas oleovorans* in river water microcosms. *Rev Argent Microbiol* 31:201-4.

20. Ruiz, J. A., N. I. Lopez, R. O. Fernandez, and B. S. Mendez. 2001. Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. *Appl Environ Microbiol* 67:225-30.
21. Ruiz, J. A., N. I. Lopez, and B. S. Mendez. 2004. rpoS gene expression in carbon-starved cultures of the Polyhydroxyalkanoate-accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. *Curr Microbiol* 48:396-400.
22. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor. N.Y.
23. Schlegel, H. J., G. Gottschalk, and R. von Bartha. 1961. Formation and utilization of poly-b-hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature* 191:463-465.
24. Thompson, R. C., Y. Olsen, R. P. Mitchell, A. Davis, S. J. Rowland, A. W. John, D. McGonigle, and A. E. Russell. 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304:838.
25. Vogel HJ, Bonner BN. 1956. Acetyl-ornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* 218:97-106

Alejandra de Almeida es estudiante de Ciencias Biológicas.

Jimena A. Ruiz es Doctora en Ciencias Biológicas y docente investigadora de la Universidad de Buenos Aires.

Nancy I. López es Doctora en Ciencias del Mar, docente investigadora de la Universidad de Buenos Aires e investigadora del CONICET

*M. Julia Pettinari es Doctora en Ciencias Biológicas, docente investigadora de la Universidad de Buenos Aires e investigadora del CONICET. E-mail: jul@qb.fcen.uba.ar

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista Química Viva
Número 3, año 3, septiembre 2004
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar