

Entrevista a Carolina Vera, Vicedecana

“Me sentiría satisfecha si Exactas fortaleciera su proyecto institucional y que todos los investigadores se sintieran parte”

Por Susana Gallardo y Julia Pettinari

Carolina Vera es doctora en Ciencias de la Atmósfera, profesora adjunta en el Departamento de Ciencias de la Atmósfera y los Océanos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA e investigadora del Conicet. Su tema de trabajo es la variabilidad y el cambio climático, y en los últimos tiempos centró su estudio en la influencia de fenómenos remotos sobre el clima de Sudamérica, por ejemplo el fenómeno que se conoce como “El Niño”. Es vicedirectora del Centro de Investigaciones del Mar y la Atmósfera (CIMA) y, desde marzo de 2006, es la primera vicedecana de la FCEyN. Además de numerosos artículos de investigación, acaba de publicar, junto con su colega Inés Camilloni, el libro *El aire y el agua en nuestro planeta*, en la colección Ciencia Joven de Eudeba. Tiene 44 años y dos hijos, Juan de 16, y Lucía de 11.

Química Viva: ¿Cómo surge la decisión de postularse para el cargo de vicedecana?

Carolina Vera: En los últimos años dediqué parte de mi tiempo a la coordinación de programas científicos en Sudamérica y el hemisferio sur. Le dediqué mucho tiempo a esa tarea, que dio sus frutos, porque mejoró mucho la interrelación entre los grupos de investigación. Pero me parecía que estaba trabajando mucho tiempo hacia afuera, y tenía ganas de volver a colaborar con la gestión de la Facultad. Mi primera intención fue participar del Consejo Directivo. No había tenido esa experiencia. Luego Jorge Aliaga (el actual decano) me propuso acompañarlo en la gestión. Al principio me parecía que estaba quemando demasiadas etapas juntas. Pero me entusiasmé, porque Jorge es una persona muy trabajadora, tiene mucha visión, y me daba gusto acompañarlo.

QV: ¿No había sido miembro del consejo departamental (Codep)?

CV: Sí, fui miembro del Codep, y soy vice-directora del CIMA. Y afuera tuve responsabilidades de coordinación de programas de investigación. Pero hacia la Facultad, hacia el Decanato, no había participado.

QV: ¿Es la primera mujer que logra ser vicedecana por elección?

CV: Ha habido decanas en otras Facultades, vicedecanas y también una vicerrectora. Pero en Exactas, al menos según la gente del Programa de Historia, no hay registros de una mujer en el Decanato. Pero es bueno marcar también que en las secretarías hay

mayoría de mujeres. Sólo el secretario de Investigación y el subsecretario de Extensión son de sexo masculino.

QV: ¿Esta mayor presencia femenina tiene un significado especial, o implica algún cambio?

CV: Quiero destacar que soy la primera mujer vicedecana, pero también la primera meteoróloga, lo cual no es poco, después de Rolando García (decano desde 1963 a 1966, y también meteorólogo). De todos modos, creo que en nuestra Facultad no hay diferencia entre hombres y mujeres en la gestión ni en la toma de decisiones.

QV: En la planta docente hay mayoría de mujeres, por eso llama la atención que sea la primera vez que hay una mujer en el Decanato.

CV: Es algo que se está dando en forma gradual. Actualmente, de las nueve o diez personas que están a cargo de la gestión, sólo tres son varones. Por lo menos aquí las cosas están cambiando. En el Conicet, no pasa eso, y tampoco en otras áreas y otras instituciones. Incluso en la meteorología, en el exterior es una disciplina con predominio de hombres, a diferencia de nuestro departamento, donde las mujeres somos mayoría.

QV: Esta presencia femenina, ¿le puede dar un tono diferente a la gestión?

CV: Por un lado, pienso que el hecho de ser mujer hace que otras mujeres se acerquen con mayor facilidad, tienen una sensación de cercanía o de inmediatez. Pero, por otro lado, creo que la diferencia se da no tanto por el género, sino por la edad. Cuando vamos con el decano a las reuniones en del Rectorado, nosotros somos los más jóvenes. Lo que rescato es el desafío generacional que esto representa. Sin embargo, cuando Rolando García fue decano era más joven que nosotros.

QV: ¿Cómo se concilian las responsabilidades familiares, la investigación y la tarea de gestión?

CV: Desde el inicio de mi carrera científica y académica, he concentrado parte de mi tiempo en tareas por el bien común. Ahora viajo menos, pero tengo más reuniones. Mi día empieza temprano, dejo a mi hija en la escuela y vengo a la Facultad. Y me puedo llegar a quedar varios días hasta las 8 de la noche. Trato de optimizar el tiempo al máximo. Como me muevo con una *notebook*, y ahí está todo mi trabajo, cuando tengo un momento, me pongo a trabajar. Pero también defiendiendo mi tiempo personal, y trato de encontrarlo. Por ejemplo, el fin de semana, me levanto temprano y me pongo a trabajar, pero cuando todos se despiertan, cierro la computadora, y me dedico a la familia.

QV: ¿Tuvo que renunciar a algo, por ejemplo a la investigación?

CV: Antes quizás podía tener muchos más estudiantes, muchas más líneas abiertas, con mucha más gente que dependía de mí. Y ahora no puedo mantenerlo, sería

irresponsable, no me gustan los directores que no pueden dedicarle tiempo a los estudiantes. Yo los sigo mucho. Entonces reduje el número de personas que están colaborando conmigo. Trato de mantener las reuniones con ellos por la mañana, en que hay mayor tranquilidad.

QV: ¿Cuál es el proyecto para esta gestión?

CV: Nosotros trabajamos mucho en equipo, tanto con el decano y los secretarios como con los consejeros. Es un grupo de gente con la que me siento cómoda. Si bien intento contribuir en todos los temas que se presentan, me he concentrado particularmente en la parte académica. Una de las ideas es promover programas interdisciplinarios de formación. Hasta ahora los doctorados dependen mucho de los departamentos, pero ciertas investigaciones atraviesan los departamentos, porque se encarar los temas tomando distintos elementos de varias disciplinas. La estructura de los programas de doctorado es muy rígida, y hay mucho por hacer. En este sentido, Rolando García nos dijo algo clave: “los departamentos ya están obsoletos, hay que ir a los programas”. Por ejemplo, uno tiene un objeto de estudio, pero puede ser que varios departamentos confluyan en él. La idea es trabajar en ello. Quizás se pueda empezar con unos pocos, que sean casos testigo, para después ver si es necesario generalizar la estructura. Otro de los temas pendientes son los planes de estudio.

QV: Que también están orientados desde el punto de vista de los departamentos...

CV: El problema es que la gente es muy reacia al cambio, se preguntan “¿dónde va a quedar mi materia?” Pero se requieren cambios profundos. Esa es otra meta que tenemos. En general, lo que me interesa es no sólo mejorar la relación entre departamentos, sino también la relación entre éstos y el Consejo Directivo y las secretarías. Puede suceder que se tomen decisiones que tal vez se opongan a las expectativas de un departamento, por ejemplo, pero, si bien debe primar lo que sea mejor para la Facultad, también esas decisiones pueden tomarse con una interacción mayor con los involucrados. Es una manera de encarar la gestión que nos hemos propuesto y lo llevamos a cabo con ciertos temas, como los concursos, o la planificación de infraestructura.

QV: ¿Hay una iniciativa sobre una comisión de derechos humanos?

CV: Creemos que el tema de derechos humanos es muy importante, lo iniciamos con los actos del 24 de marzo, lo hemos continuado y una de las actividades que estamos realizando es la depuración de las listas de desaparecidos de esta Facultad. Cuando era estudiante participé en la elaboración de esa lista, en los años 82 y 83. Allí se incluyeron algunos nombres de investigadores que luego se supo pertenecían a otras universidades. Entonces se está mejorando esa lista, lo cual no quiere decir que borremos la anterior. La razón de esto es que ahora hay en marcha varias causas penales (la causa Esma, por ejemplo), y algunas instituciones se están presentando como querellantes. Si nos presentamos como querellantes, esa lista necesita ser depurada. Hay también otros temas de derechos humanos en carpeta, que vamos a difundir pronto.

QV: ¿Cómo ve la vinculación de la Universidad en general, y de la Facultad en particular, con la sociedad? ¿En qué temas cree que debe involucrarse?

CV: El concepto de universidad con que nos manejamos, y que tenía auge en la década del 60, tiene tres patas: la enseñanza, la investigación y la extensión. Esta última se refiere a la relación con la sociedad, y a la posibilidad de que la universidad directamente pueda resolver problemas de la sociedad. En tal sentido, una de las cosas que iniciamos es el proyecto Exactas con la sociedad. Como la Facultad tiene recursos propios, se tomó la decisión de tomar parte de esos recursos para financiar estos proyectos. Hubo una convocatoria y se presentaron más de veinte proyectos.

QV: ¿Cuál es el propósito del proyecto?

CV: El propósito es desarrollar una investigación, o una actividad de docencia, que tenga una contraparte en la sociedad. Pueden participar estudiantes o docentes de la Facultad y personas o instituciones de la sociedad, puede ser un barrio. No hemos definido temas prioritarios. La idea es hacer actividades que generen un cambio sustancial. Lo único que existió parecido fue UBANEX que hizo la secretaría de Extensión de UBA. Además, dado que se generó una buena sinergia entre Exactas y las Facultades de Sociales, Filosofía y Letras y Arquitectura, y en todas ellas, el tema de extensión es considerado como muy importante, la idea es avanzar juntos en esa dirección. También va a haber unas jornadas en septiembre, donde las cuatro Facultades plantean el tema y se obtendrán conclusiones para definir prioridades.

QV: ¿El acercamiento al secundario también tiene que ver con este objetivo?

CV: El tema de la orientación vocacional, que funciona en la Facultad desde hace un tiempo, es otro de los temas prioritarios que queremos fortalecer. A partir de la Ley de Educación queríamos discutir el rol de la Universidad en la formación de los docentes secundarios. Hay iniciativas en algunos departamentos. Pero queremos ver si desde la Facultad se le puede dar una integración a esto.

QV: ¿Cómo ve el actual conflicto de la UBA y cómo afecta a la Facultad de Exactas?

CV: El conflicto en la UBA generó una crisis que es lógico que se diera. Durante mucho tiempo se han mantenido estructuras y situaciones que en algún momento iban a colapsar. La elección del rector disparó esos conflictos que estaban latentes. Es malo que no se pueda llegar a una solución. Pero lo bueno es que esto generó una discusión del modelo de Universidad que quizá no se hubiera dado. Esta Facultad es lo que más se parece al ideal de Universidad que había en los 60. Por ejemplo, el concepto de profesor investigador, así como los concursos transparentes y periódicos. La planta de profesores por concurso es la más alta de la Universidad, y eso hace que la calidad de esos profesores sea evaluada en forma permanente, y mejorada. No tenemos docentes *ad honorem*, hasta los auxiliares los concursamos. Es decir, hemos ido cumpliendo con ese modelo de Universidad pero es necesaria una actualización. un replanteo, que tenga en cuenta realidades que no existían hace cuarenta años.

QV: ¿Considera que se trata de una crisis política?

CV: Es una crisis política, y obviamente institucional. Pero esto no significa que la institución no haya seguido trabajando. Actualmente, el problema serio es el presupuesto, que no fue aprobado, y lograr que la asamblea se realice para elegir el rector y para iniciar el proceso por las reformas del estatuto.

QV: ¿Cómo cree que se puede solucionar el problema del rector?

CV: Una de las cosas que hay que rescatar es que nuestro decano, junto con los de Filosofía y Letras, Sociales y Arquitectura fueron los únicos que llevaron propuestas con una intención de promover el diálogo, y esas propuestas fueron las únicas que dieron resultado. Siempre estuvimos en el medio de situaciones extremas, y nuestra Facultad siempre tendió a encontrar una salida institucional. Ahora el diálogo se está ampliando a una mayor cantidad de sectores. Esa es la manera, tratar de ponernos de acuerdo. Lo mejor es no apurar el proceso e ir tema por tema. Ahora la Facultad y los decanos se pusieron de acuerdo en avanzar en estos dos temas principales: el presupuesto y que se haga la Asamblea. Siempre nos opusimos a que un sector imponga sus ideas sobre el resto, aun teniendo mayoría.

QV: ¿Cuáles son las responsabilidades específicas del vicedecano?

CV: El vicedecano es un consejero, la primera responsabilidad es su actuación en el Consejo Directivo. Y la otra es reemplazar al decano en todas esas actividades que él no pueda realizar, por ejemplo porque está de viaje, desde las cotidianas, como una jura, o presidir el Consejo Directivo, hasta colaborar en representación de la Facultad en el Consejo Superior, lo que lleva bastante trabajo. Y después, todo lo que uno quiera desarrollar. No tiene la carga administrativa que tiene el decano ni los secretarios, que deben firmar expedientes.

QV: ¿Qué cosas se podrán lograr de aquí a que termine la gestión?

CV: El plan de obras, mantenimiento e infraestructura. Eso es un cambio importante. La Facultad, en las últimas gestiones, ha mejorado mucho su funcionamiento interno, el tema de concursos y la parte administrativa, pero falta mucho por hacer en la infraestructura edilicia, debido a la falta de presupuesto. Otro punto importante es el tema académico: planes de estudio, la reformulación del doctorado y el análisis de las maestrías, que han crecido desordenadamente sin un marco adecuado. También el tema de extensión. En relación con la investigación, los grupos pueden trabajar bien, obtienen fondos y subsidios para realizar sus tareas. Pero, en relación con la infraestructura, debemos lograr que puedan trabajar en las mejores condiciones posibles, y generar nuevos espacios, para poder incorporar nueva gente. Otro tema es la vinculación tecnológica. Para esta gestión es muy importante la relación con el sector productivo, privado o público. Y se está avanzando en esa línea. Ahora se abre una convocatoria a proyectos de incubadora de empresas. Ya hubo, pero ahora se abre una nueva. La secretaria de investigación adjunta, Laura Pregliasco, está concentrada en este tema. La novedad en esta gestión, es que los secretarios adjuntos no solo colaboran con los secretarios, sino que tienen una tarea específica. Por ejemplo, la secretaría académica

adjunta se ocupa de concursos, y cotidianamente sigue todos los concursos. Y en la Secretaría de Investigación, el secretario adjunto fue designado para que se ocupe en particular de la vinculación con la empresa.

QV: ¿Cuál es la postura respecto de la divulgación de la ciencia?

CV: Esta gestión está muy interesada en la divulgación de la ciencia. Lo que notamos es que hay muchos esfuerzos individuales, por ejemplo, esta revista (*QuímicaViva*), también en el departamento de Física hicieron cosas interesantes en la WEB, que están dispuestos a extender. Y el trabajo que realiza el Centro de Divulgación Científica de la Facultad. Deberíamos juntar a todos los actores. Se necesita mejorar la centralización de todo lo que se está haciendo.

QV: ¿Qué es lo más importante que quisiera cumplir?

CV: Lo que quisiera es que esta gestión pudiera fortalecer los lazos internos, estaría satisfecha si cualquier investigador siente que la Facultad lo apoya. Y que la Facultad tenga una voz más clara hacia afuera. A veces Exactas tiende a aislarse, porque estamos bien y tenemos buenas relaciones con el exterior, pero nos falta mejorar la relación con la ciudad, con la sociedad. Al menos ya hemos iniciado buenos diálogos con el Gobierno de la Ciudad.

QV: ¿Cómo se logra el fortalecimiento de los lazos internos?

CV: Encarando nuevos proyectos que involucren a todos, ya sea en temas académicos o científicos. Es una forma de trabajar y pensar la Facultad, que se tiene que plasmar en las actividades particulares de las que estuvimos hablando. Así como se ve la Universidad como un consorcio de Facultades, no quisiera que Exactas fuera percibida como un consorcio de departamentos, sino que tenga una entidad. Para ello habrá que atravesar la barrera de los departamentos.

Dengue: Un viejo y nuevo desafío para la quimioterapia antiviral

Elsa B. Damonte*

Laboratorio de Virología. Departamento de Química Biológica.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
Ciudad Universitaria. Pabellón 2. Piso 4. C1428EGA. Capital Federal. Argentina.
edamonte@qb.fcen.uba.ar

Recibido: 21/07/2006.

Aceptado: 7/08/2006

Resumen

El virus dengue (DENV) es un flavivirus presente en la naturaleza en forma de cuatro serotipos. Se transmite al hombre por mosquitos del género *Aedes*, ocasionando un síndrome febril conocido desde hace varias centurias y llamado fiebre de dengue. En las últimas décadas, la expansión epidemiológica de la fiebre de dengue en todo el mundo y la emergencia de formas más severas de la enfermedad, como la fiebre hemorrágica de dengue, a causa de infecciones secuenciales en una misma comunidad con distintos serotipos virales, han convertido a esta virosis en un serio problema para la salud pública internacional. A pesar de que se estima que en la actualidad se producen entre 50 y 100 millones de casos de fiebre de dengue en todo el mundo, no hay ninguna vacuna ni quimioterapia específica para su prevención o tratamiento.

En los últimos años, el conocimiento parcial del ciclo de multiplicación del virus en la célula huésped y de las características estructurales y funcionales de las proteínas virales ha impulsado el estudio de diversos blancos potenciales para la acción antiviral, ya sea a través del diseño racional de inhibidores o mediante el ensayo empírico de compuestos de síntesis y productos naturales. Así se están evaluando inhibidores que afectan la entrada del virus a la célula, la replicación del RNA viral, la proteasa viral responsable del clivaje de la poliproteína precursora, la maduración de las glicoproteínas virales, y la expresión del genoma viral. Se alcanzaron resultados promisorios, en algunos casos extendidos a ensayos en modelos experimentales in vivo, lo que alienta las perspectivas de lograr una quimioterapia efectiva para combatir el dengue.

Palabras clave: dengue, fiebre hemorrágica, agentes antivirales

Abstract

Dengue virus (DENV) is a flavivirus transmitted to humans by mosquitoes of the genus *Aedes*, causing a febrile illness known several centuries ago and called dengue fever. In the last decades, the global epidemiology of dengue fever has expanded and a more severe form of the disease, dengue hemorrhagic fever, has emerged as consequence of sequential infections in a community with different viral serotypes. Dengue virus is now a major global public health problem. It is estimated that up to 100 million cases of dengue fever occur annually on a worldwide basis. So far, there is no vaccine licensed for prevention in humans and no therapeutic agents are available for treatment of patients.

The knowledge of the virus multiplication cycle as well as the structural and functional characteristics of the virion components is essential to elucidate potential targets of antiviral therapy. For DENV, the partial information available has allowed the in vitro screening of diverse classes of compounds and their identification as effective inhibitors of the viral entry, the viral RNA replication, the protease responsible of the viral polyprotein cleavage, the glycoprotein maturation and the viral genome expression. In addition, the evaluation of some agents was extended to in vivo experimental animal models, increasing the future perspectives to obtain an effective chemotherapy for treatment of human DENV infections.

Key words: dengue, hemorrhagic fever, antiviral agents

Luego de un prolongado período en el que la incidencia del dengue en la población se había reducido ostensiblemente, en los últimos años la preocupación por esta enfermedad resurgió como un problema grave para la salud pública internacional.

El virus del dengue (DENV) fue aislado por primera vez a partir de sangre de pacientes en 1907 (1). Este virus es un miembro del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, transmitido al hombre por mosquitos de las especies *Aedes aegypti* (principal vector) y *A. albopictus*. La partícula viral tiene un genoma de RNA simple cadena de polaridad positiva, dentro de una cápside con simetría icosaédrica, y rodeado por una envoltura externa. Hay cuatro serotipos virales (DENV-1,-2, -3 y -4) que están distribuidos en las áreas tropicales y subtropicales en todo el mundo, junto con el mosquito vector. La infección con un serotipo otorga protección de por vida al individuo frente a la reinfección homóloga, pero no protege contra la infección con otro serotipo de DENV.

Reemergencia global del dengue

Los primeros reportes de brotes epidémicos de una enfermedad con características clínicas compatibles con la fiebre del dengue (DF, del inglés “dengue fever”) datan de los años 1779-1780 en diferentes países de Asia, Africa y América del Norte (2). Desde entonces y hasta alrededor de 1940, las manifestaciones de la enfermedad eran esporádicas, en forma de grandes epidemias intermitentes con intervalos de décadas entre cada una de ellas, debido principalmente a que tanto mosquitos como virus eran transportados de un punto geográfico a otro a través de los barcos. Sin embargo, la presencia endémica del virus quedaba evidenciada por el desarrollo de DF durante los períodos interepidémicos en visitantes que nunca habían estado en contacto con el DENV y llegaban a distintos centros urbanos tropicales. La presentación clínica de la DF se caracteriza por un síndrome febril suave durante 2-7 días, dolor intenso en las articulaciones y los músculos, cefalea, náuseas, inflamación de los ganglios linfáticos y erupciones en piel.

La epidemiología y dinámica de trasmisión de DENV cambió drásticamente a consecuencia de la llamada segunda guerra mundial, luego de 1940, en el sudeste asiático. La irrupción y movimientos de las tropas expandieron la distribución geográfica de todos los serotipos virales así como la presencia y densidad del *A. aegypti*. La diseminación de virus y vectores se incrementó luego de la guerra por el rápido crecimiento de la población, la urbanización desmedida, las condiciones sanitarias deficientes y el grado de polución en las ciudades (3). Asimismo, la aceleración en las comunicaciones a través de los viajes aéreos favoreció el movimiento de individuos virémicos dentro y fuera de la región. Este conjunto de factores condujo al establecimiento de un estado hiperendémico de infección por dengue en la región, con epidemias anuales causadas por la cocirculación en una misma comunidad de los cuatro serotipos y, consecuentemente, una mayor frecuencia de infecciones secuenciales en niños (4). Así fue que en 1954 emergió en Filipinas una nueva forma de enfermedad conocida como fiebre hemorrágica de dengue (DHF, del inglés “dengue hemorrhagic fever”), seguida luego por epidemias en Tailandia, Malasia, Singapur, Vietnam, India, Pakistán, China e islas del Pacífico (1). La DHF comienza con los mismos signos que la DF, pero luego se produce un rápido deterioro del paciente, con dificultades en la respiración, anormalidades

en la hemostasia, permeabilidad vascular incrementada, deshidratación y múltiples manifestaciones hemorrágicas. En su forma más severa, conocida como síndrome de shock de dengue (DSS, del inglés "dengue shock syndrome"), los pacientes experimentan hipovolemia y falla circulatoria. La mortalidad por DHF/DSS puede alcanzar al 20 %, siendo una causa principal de hospitalización y muerte en niños en la región.

Los cambios epidemiológicos en las Américas han sido aún más dramáticos que en Asia. Entre 1940 y 1970, las epidemias de dengue eran muy raras ya que el vector *A. aegypti* había sido erradicado de la región. El programa de erradicación se discontinuó en la década del 70, el mosquito reinfestó el continente y, simultáneamente, reapareció el dengue epidémico. La introducción de nuevos serotipos y cepas provenientes de Asia condujo a la producción de brotes epidémicos severos anuales en países que habían estado libres de la enfermedad por 30-130 años (1). La DHF emergió por primera vez en el continente en 1981, en Cuba (5), y posteriormente en muchos otros países americanos.

En la actualidad, el mosquito y el virus continúan su expansión global, y la Organización Mundial de la Salud estima que entre 50 y 100 millones de casos de DF y 250.000-500.000 casos de las formas más severas DHF/DSS ocurren cada año, con un fuerte impacto sanitario, social y económico en más de 100 países de todo el orbe (6).

Situación actual en el tratamiento y prevención de la enfermedad

A pesar de la vieja historia del dengue en el mundo y la grave situación descrita, no se dispone en la actualidad de vacunas preventivas ni drogas antivirales específicas para el tratamiento del dengue, que sólo consiste en terapia de apoyo para reducir las consecuencias de la fiebre, deshidratación, hipotensión y hemorragias en el paciente. Esta falencia probablemente se debe a que el dengue no era percibido como un problema sanitario de importancia, sumado al hecho de que la mayoría de los individuos que sufren de estas dolencias asociadas a DENV se encuentran en los países del Tercer Mundo. El resurgimiento y expansión epidemiológica del virus y la emergencia de DHF/DSS en las últimas décadas ha cambiado esta situación, resultando en un mayor apoyo e impulso para los estudios tendientes al desarrollo tanto de una vacuna como de la quimioterapia anti-dengue.

Las dificultades en desarrollar una vacuna efectiva se centran en el requisito indispensable de una vacuna tetravalente protectora contra los cuatro serotipos. Es conocido que los anticuerpos heterotípicos preexistentes en un individuo que ha sufrido DF representan un factor de riesgo para DHF, por el efecto aumentador de la infección que ejercen al facilitar la entrada a la célula del serotipo reinfestante (7). Por lo tanto, una inmunización parcial con una vacuna monovalente implicaría un riesgo aumentado en el individuo vacunado de sufrir una forma más severa de enfermedad ante una infección con alguno de los otros tres serotipos. En estos momentos, hay diversos proyectos en desarrollo que intentan construir vacunas recombinantes que expresen las proteínas externas de todos los serotipos (8, 9), pero aún hay un largo camino a recorrer hasta la obtención de un inmunógeno efectivo y seguro.

Ciclo de multiplicación del virus: Blancos potenciales para el desarrollo de antivirales

El desarrollo de antivirales requiere del conocimiento del ciclo de multiplicación del virus en la célula huésped así como las características estructurales y funcionales de las proteínas virales, a fin de hallar los blancos más adecuados para bloquear la infección.

En la Fig. 1 se muestra un esquema probable del ciclo de vida del DENV ya que aún se carece de información sobre el mecanismo de varias etapas del proceso. La adsorción del virus a la célula comienza con la unión de la glicoproteína E de la envoltura viral con un receptor de la membrana plasmática celular, seguida de la entrada de la partícula viral que conduce al desnudamiento y liberación del genoma viral en el citoplasma. Tanto la naturaleza del receptor (residuos de heparan sulfato o proteínas) como el mecanismo de entrada (endocitosis o fusión en membrana) están aún en discusión. El genoma viral es una molécula de RNA de polaridad positiva, que posee en su extremo 5' una guanina metilada o "cap" y una secuencia que lo une al ribosoma (IRES, del inglés "internal ribosome entry site"). Allí, el genoma es inmediatamente traducido a una única poliproteína, que es procesada por proteasas virales y celulares para producir simultáneamente todas las proteínas virales: las tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS), que cumplen diversas funciones en el ciclo (Fig. 2). La RNA polimerasa RNA dependiente viral (NS5), asociada a otras proteínas NS, replica el RNA genómico produciendo una molécula complementaria de RNA de polaridad negativa, la que a su vez actúa como templado para la síntesis de nuevas cadenas de RNA de polaridad positiva. Las réplicas de genoma viral son encapsidadas por la proteína C y luego, las nucleocápsides adquieren su envoltura por brotación a partir de la membrana del retículo endoplásmico hacia el espacio luminal. A partir de allí, las partículas virales son transportadas por el sistema exocítico secretorio hacia la superficie en tanto que las glicoproteínas virales adquieren su forma madura por procesamiento de los residuos hidrocarbonados en el sistema de Golgi y, finalmente, los viriones son liberadas al medio extracelular por fusión de la vesícula de transporte con la membrana plasmática.

A lo largo del ciclo de vida descrito, hay varios puntos que están siendo objeto de estudio como potenciales blancos antivirales (10, 11), que se reseñarán a continuación.

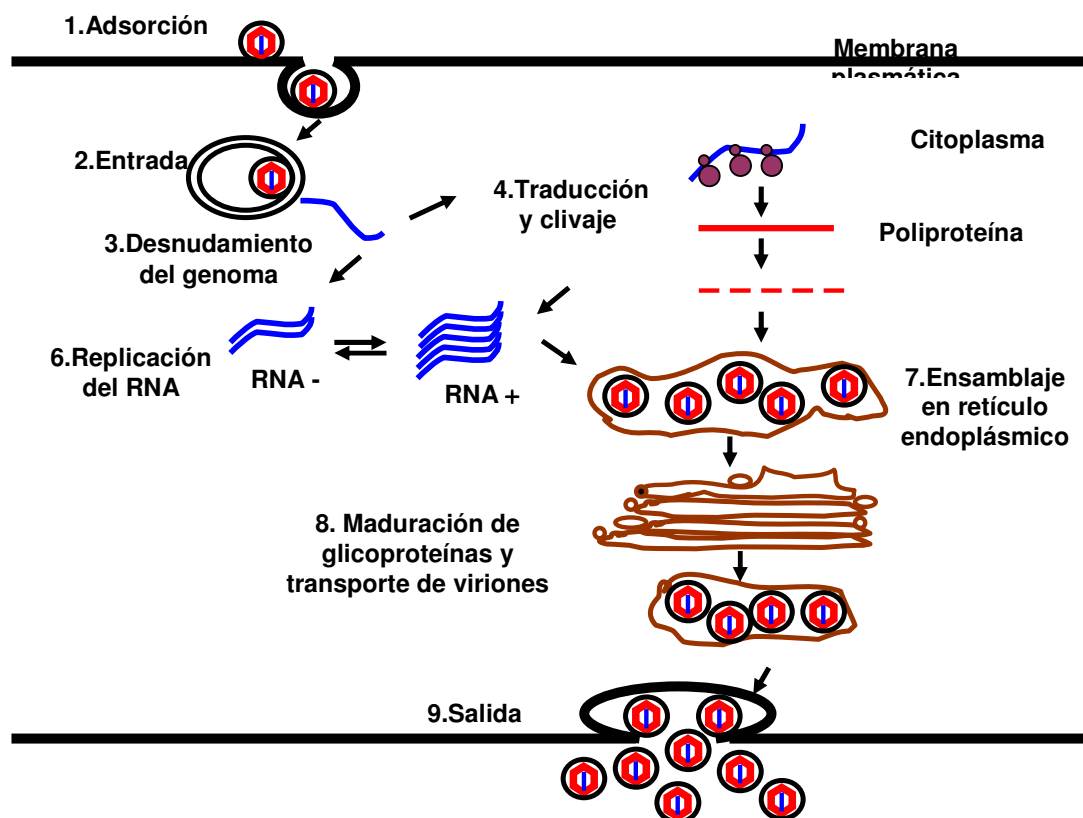


Figura 1. Esquema del ciclo de multiplicación del DENV

Inhibidores de la síntesis de RNA

Siguiendo los pasos y la experiencia acumulada con otras virosis, los primeros intentos para encontrar sustancias antivirales contra DENV, y los flavivirus en general, se centraron en el ensayo de probables inhibidores de la síntesis del RNA viral, en particular inhibidores de la síntesis de nucleósidos trifosfatos. Entre ellos, uno de los compuestos más estudiados ha sido la ribavirina, un análogo de guanósina de amplio espectro antiviral *in vitro* contra diferentes virus con genoma de RNA. Su principal modo de acción parece ser por inhibición de la enzima celular inosina monofosfato dehidrogenasa (IMPDH), afectando la biosíntesis del nucleótido guanósina trifosfato (GTP), aunque en forma reciente, se ha demostrado que la ribavirina actúa además como un mutágeno en el RNA, forzando a los RNA virus a una acumulación letal de mutaciones llamada catástrofe de errores, efecto que se complementaría con su actividad de inhibidor de la IMPDH (12). La ribavirina en combinación con interferón es la actual terapia en uso clínico para el tratamiento de la hepatitis C, otro miembro de la familia *Flaviviridae*. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la ribavirina contra DENV es muy débil y poco selectivo debido a su acción citostática (13-15). El ensayo de un gran número de compuestos ha permitido hallar en los últimos años algunas sustancias más efectivas que la ribavirina y con perspectivas promisorias por su efecto inhibitorio sobre la replicación del RNA de DENV, que incluyen varios análogos de nucleósidos, sustancias de estructura heterocíclica y el ácido micofenólico (10, 13-17).

Inhibidores de la proteasa

La estrategia terapéutica de inhibir proteasas virales tiene su precedente exitoso en los inhibidores de proteasa de HIV, claves para el tratamiento combinado actual de los pacientes con SIDA. En el caso de DENV, la proteína NS3 tienen un dominio de serina-proteasa en el extremo N-terminal, que en conjunto con la proteína NS2B como cofactor activante, cataliza los clivajes en los sitios NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 de la poliproteína precursora (Fig.2), y también en sitios adicionales dentro de C, NS4A y NS3, en tanto que furina y proteasas celulares actúan en los sitios remanentes. Se ha logrado caracterizar parcialmente los requisitos necesarios para la actividad proteolítica de NS3, produciéndose inhibición en el clivaje con compuestos peptídicos derivados de distintos sitios de la poliproteína viral (18, 19). La proteína NS3 parece tener requerimientos únicos e inusuales por residuos dibásicos como sustratos que alientan el diseño de inhibidores selectivos que no inactiven las proteasas celulares esenciales para las funciones fisiológicas, pero aún son necesarios muchos estudios para optimizar el diseño racional de drogas péptido-miméticas de máxima eficacia in vivo.

NS3 es una proteína multifuncional que posee, además, actividades de 5'RNA trifosfatasa, nucleósido trifosfatasa y RNA helicasa, las que también pueden ser blancos antivirales atractivos, pero aún no han sido encarados en DENV.

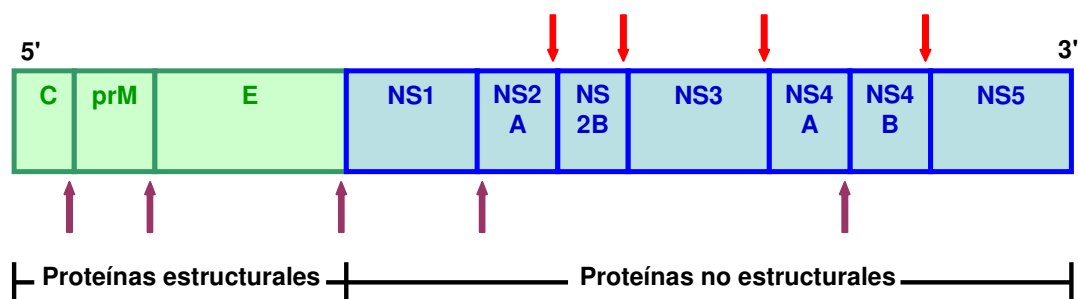


Figura 2. Esquema de la poliproteína precursora de DENV y su clivaje proteolítico. Las flechas rojas indican los sitios de clivaje por la proteasa viral NS3/NS2B y las flechas violetas, los clivajes realizados por enzimas celulares.

Inhibidores de la entrada

El bloqueo de la entrada del virus a la célula es una estrategia antiviral interesante ya que representa una barrera para impedir la iniciación de la infección (20). Aquí el blanco de ataque es la glicoproteína E en su interacción con componentes de la membrana celular que permiten la unión e internalización del virus (Fig.1). A partir del hallazgo del heparan sulfato de los proteoglicanos celulares como receptor para el DENV en ciertos tipos de células, se ha demostrado la eficacia anti-DENV in vitro de sustancias polianiónicas de estructura diversa, como heparina, suramin, polioxometalatos, carragenanos y galactanos extraídos de algas marinas (21-27). El modo de acción de los polisulfatos es por inhibición tanto de la adsorción del virus como su posterior internalización

(26). La capacidad inhibitoria de este tipo de compuestos está relacionada con el grado y tipo de distribución de las cargas negativas y su peso molecular elevado (28), lo que puede representar una seria desventaja para su uso clínico en forma sistémica. Sin embargo, es interesante destacar un trabajo reciente que mostró un efecto protector en un modelo murino de dengue de un oligosacárido sulfatado de menor peso molecular, que mimetiza la estructura del heparan sulfato (29), lo que abre nuevas perspectivas en la potencialidad de estos agentes.

El reciente conocimiento de las características estructurales de la glicoproteína E de DENV ha permitido definirla como una proteína de fusión de clase II compuesta predominantemente de hojas beta. Con estas bases, se han utilizado algoritmos físico-químicos para el diseño racional de péptidos dirigidos hacia la proteína E como inhibidores potenciales de la reacción de fusión necesaria para la entrada viral. Así se han detectado péptidos inhibidores, que actúan en forma específica dependiente de su secuencia, y que podrían utilizarse como compuestos líderes para el desarrollo de drogas peptídicas para bloquear la infección con DENV (30).

Maduración: inhibidores de α -glucosidasa

La glicoproteína E también es un blanco antiviral, junto con la proteína prM, por su funcionalidad en las etapas finales del ciclo de multiplicación. El ensamblaje y posterior liberación de las partículas virales requiere de la asociación de E con prM en las membranas del retículo antes de la brotación de los viriones, para lo cual debe haber un correcto procesamiento post-traducciona l y plegamiento de ambas proteínas. Los inhibidores de la α -glucosidasa celular castanospermina y deoxinojirimicina impiden la remoción de las glucosas terminales en los N-glicanos de E y prM, las proteínas no adquieren un plegamiento normal y se bloquea la morfogénesis de los viriones, resultando en una infección no productiva (31, 32). Este tratamiento tiene perspectivas de ser ensayado en humanos ya que recientemente se ha demostrado que la castanospermina, un alcaloide de origen natural, es selectivo en su efecto sobre la glicoproteína de DENV respecto de las glicoproteínas celulares y previene la mortalidad por DENV-1 en un modelo murino (33).

Inhibición a nivel de la expresión génica

La información disponible sobre la secuencia y organización de los genomas virales ha permitido encarar una estrategia antiviral dirigida directamente a bloquear la expresión del genoma, utilizando pequeños oligonucleótidos antisentido, es decir una cadena simple de DNA de 15-20 nucleótidos complementaria a una secuencia determinada del RNA genómico de DENV. Así se forma un duplex RNA-DNA que impide la expresión génica. Las principales dificultades en el uso de oligonucleótidos como agentes terapéuticos son su entrada a la célula y su estabilidad frente a la acción degradativa de las nucleasas, y para intentar superarlas los oligonucleótidos son modificados por agregado de distintos sustituyentes químicos. Así se han ensayado exitosamente contra DENV in vitro oligonucleótidos fosforotioatos con grupos propinilo en los C-5 de uridinas y citidinas y fosforodiamidato morfolino-oligómeros conjugados a péptidos de arginina (34-36). En ambos casos, los mejores resultados se obtuvieron con oligos reactivos con secuencias de las regiones no

codificantes de los extremos 3' y 5' del RNA genómico, introduciendo así un nuevo blanco potencial de ataque en DENV.

En conclusión, en este momento hay numerosas líneas de investigación sobre inhibidores de diversos blancos potenciales antivirales en el ciclo de multiplicación in vitro del DENV. Se han obtenido resultados positivos, en algunos casos extendidos a modelos experimentales in vivo, por lo que cabe alentar buenas perspectivas de contar en un futuro no muy lejano con una quimioterapia específica y efectiva para combatir las distintas formas clínicas de dengue.

Referencias

1. Gubler DJ, 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.
2. Carey DE, 1971. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci* 26: 243-262.
3. Gubler DJ, Meltzer M, 1999. The impact of dengue/dengue hemorrhagic fever in the developing world. *Adv. Virus Res* 53: 35-70.
4. Monath TP, 1994. Dengue: The risk of developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2395-2400.
5. Kouri G, Guzmán MG, Bravo J, 1986. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bull Pan Am Health Organ* 20: 24-30.
6. Gubler DJ, 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10: 100-103.
7. Rothman AL, Ennis FA, 1999. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257: 1-6.
8. Blaney JE, Matro JM, Murphy BR, Whitehead SS, 2005. Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. *J Virol* 79: 5516–5528.
9. Apt D, Raviprakash K, Brinkman A, Semyonov A, Yang S, Skinner C, Diehl L, Lyons R, Porter K, Punnonen J, 2006. Tetravalent neutralizing antibody response against four dengue serotypes by a single chimeric dengue envelope antigen. *Vaccine* 24: 335–344.
10. Leyssen P, De Clercq E, Neyts J, 2000. Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clin Microbiol Rev* 13: 67-82.
11. Damonte EB, Pujol CA, Coto CE, 2004. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Adv Virus Res* 63: 239-285.
12. Tam RC, Lau JYN, Hong Z, 2002. Mechanisms of action of ribavirin in antiviral therapies. *Antiviral Chem Chemother* 12: 261-272.
13. Markland W, McQuaid TJ, Jain J, Kwong AD, 2000. Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 859-866.

14. Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D, 2003. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antivir Res* 58: 73-79.
15. Diamond MS, Zachariah M, Harris E, 2002. Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. *Virology* 304: 211-221.
16. Ojwang JO, Ali S, Smee DF, Morrey JD, Shimasaki CD, Sidwell RW, 2005. Broad-spectrum inhibitor of viruses in the Flaviviridae family. *Antivir Res* 68: 49-55.
17. Puig-Basagiti F, Tilgner M, Forshey BM, Philpott SM, Espina NG, Wentworth DE, Goebel SJ, Masters PS, Falgout B, Ren P, Ferguson DM, Shi PY, 2006. Triaryl pyrazoline compound inhibits flavivirus RNA replication. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1320-1329.
18. Leung D, Schroder K, White H, Fang NX, Stoermer MJ, Abbenante G, Martin JL, Young PR, Fairlie DP, 2001. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide, substrates, and inhibitors. *J Biol Chem* 276: 45762-45771.
19. Chanprapaph S, Saparpakorn P, Sangma C, Niyomrattanakit P, Hannongbua S, Angsuthanasombat C, Katzenmeier G, 2005. Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serine protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavages sites. *Biochem Biophys Res Comm* 330: 1237-1246.
20. Altmeyer R, 2004. Virus attachment and entry offer numerous targets for antiviral therapy. *Curr Pharm Des* 10: 3701-3712.
21. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm J, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM, 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Med* 3: 866-871.
22. Lin YL, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Chen SH, Liu HS, 2002. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. *Antivir Res* 56: 93-96.
23. Pujol CA, Estévez JM, Carlucci MJ, Ciancia M, Cerezo AS, Damonte EB, 2002. Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. *Antiviral Chem Chemother* 13: 83-89.
24. Shigeta S, Mori S, Kodama E, Kodama J, Takahashi K, Yamase T, 2003. Broad-spectrum anti-RNA virus activities of titanium and vanadium substituted polyoxotungstates. *Antivir Res* 58: 265-271.
25. Ono L, Wollinger W, Rocco IM, Coimbra TLM, Gorin PAJ, Sierakowski MR, 2003. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antivir Res* 60: 201-208.
26. Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RGM, Faría PCS, Nosedá MD, Duarte MER, Damonte EB, 2005. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antivir Res* 66: 103-110.
27. Tischer PCSF, Talarico LB, Nosedá MD, Guimaraes SMPB, Damonte EB, Duarte MER, 2006. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. *Carbohydr Polym* 63: 459-465.
28. Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS, 2004. Seaweed sulfated polysaccharides as antivirals. *Curr Med Chem* 11: 2399-2419.
29. Lee E, Pavy M, Young N, Freeman C, Lobigs M, 2006. Antiviral effect of the heparin sulfate mimetic, PI88, against dengue and encephalitic viruses. *Antivir Res* 69: 31-38.

30. Hrobowski YM, Garry RF, Michael SF, 2005. Peptide inhibitors of dengue and West Nile virus infectivity. *Virology* 344: 439-452.
31. Courageot MP, Frenkiel MP, Duarte Dos Santos C, Deubel V, Despres P, 2000. α -glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 74: 264-572.
32. Wu SF, Lee CJ, Liao CL, Dwek RA, Zitzmann N, Lin YL, 2002. Antiviral effects of an iminosugar derivative on flavivirus infections. *J Virol* 76: 3596-3604.
33. Whitby K, Pierson TC, Geiss B, Lane K, Engle M, Zhou Y, Doms RW, Diamond MS, 2005. Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* 79: 8698-8706.
34. Raviprakash K, Liu K, Matteucci M, Wagner R, Riffenburgh R, Carl M, 1995. Inhibition of dengue virus by novel modified antisense oligonucleotides. *J Virol* 69: 69-74.
35. Kinney RM, Huang CY-H, Rose BC, Kroeker AD, Dreher TW, Iversen PL, Stein DA, 2005. Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in Vero cell cultures with morpholino oligomers. *J Virol* 79: 5116-5128.
36. Holden KL, Stein DA, Pierson TC, Ahmed AA, Clyde K, Iversen PL, Harris E, 2006. Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology* 344: 439-452.

* Dra. Elsa B. Damonte

Profesora Titular de Microbiología del Dpto. de Química Biológica. FCEy N. UBA
Investigadora Principal del CONICET.

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

Revista **QuímicaViva**
Número 2, año 5, agosto 2006
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...?

Carmen Sánchez de Rivas*

Departamento de Química Biológica.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
Ciudad Universitaria. Pabellón 2. Piso 4. C1428EGA. Capital Federal. Argentina.

sanchez@qb.fcen.uba.ar

Recibido: 21/07/2006.

Aceptado: 27/08/2006

Resumen

Los antibióticos (AB) son compuestos relativamente sencillos, producidos por bacterias u hongos que atacan específicamente a las bacterias. Interfieren en algún paso del metabolismo donde encuentran un blanco adecuado. Desde el descubrimiento de la penicilina, se han descubierto una docena de nuevos tipos de AB y optimizado o sintetizado cerca de una centena. Sin embargo, su eficacia se ha visto alterada por su uso excesivo o incorrecto, que conduce a la aparición y diseminación de bacterias resistentes (ABR). Estas ABR actúan impidiendo el ingreso, modificando o inactivando la droga, modificando al blanco, o activando los sistemas de enflujado. La gran capacidad de las bacterias de mutar y transferir genes, y la presencia de genes de resistencia esencialmente en plásmidos y transposones, contribuyen a su diseminación tanto entre bacterias emparentadas y/o patógenas como hacia bacterias no patógenas que son los reservorios de ABR. La sensación de haber perdido la batalla o de que las ganancias a futuro no son tan importantes, han disminuido el interés de los laboratorios farmacéuticos por buscar nuevos compuestos. Sin embargo desde la investigación básica aparecen nuevas alternativas ya sea utilizando la genómica como material de análisis de nuevos blancos, las defensas naturales del organismo huésped, u otros agentes olvidados como las bacterias predadoras y los fagos, ambos capaces de destruir bacterias.

Palabras clave: bacterias, antibióticos, resistencia

Antibiotics: yesterday, today and...tomorrow?

Summary

Antibiotics (AB) are relatively simple organic compounds produced by bacteria or fungi, killing prokaryotic cells. After the discovery of the first AB, penicillin, nearly a dozen of new and a hundred of

synthetic compounds have been characterized. However, their therapeutic efficacy has dramatically decreased, essentially due to excessive or bad use, the emergence of antibiotic resistant bacteria (ABR), and their rapid spread among pathogenic or saprophytic bacteria. A few mechanisms are involved in ABR: uptake inhibition, drug modification or inactivation, target modification or enhancement of the multiefflux pumps. The great mutation capacity and high genetic transfer efficiency, essentially due to the presence of ABR on plasmids and transposons, contribute largely to disseminate these properties among related and unrelated bacteria. These difficulties and/or a bad economic perspective has lead industrial pharmaceuticals to lose interest in research in this area. However, basic research making use of genomic analysis, host defense responses by the natural fighters and reconsideration of the destructive capacity of predatory bacteria and phages, re-open the way to pursue the combat.

Keywords: bacteria, antibiotics, resistance

Descubrimiento

Muchos descubrimientos tienen que ver con el azar y la suerte, aunque esta última requiere de la perspicacia del observador. Como dijo Louis Pasteur, y él sabía de lo que hablaba, “El azar solo favorece a los espíritus preparados”. El descubrimiento de los antibióticos no escapa a este axioma. Es a un joven escocés, Alexander Fleming, a quien se debe tal hazaña. La historia dice que investigaba en un laboratorio del hospital Saint Mary de Londres, cómo luchar contra enfermedades infecciosas y, ante todo, cómo eliminar bacterias patógenas. Ya había tenido su hora de azar-éxito observando que un cultivo de *Staphylococcus aureus* se había lisado al caérsele una lágrima. Así descubrió el rol antiséptico de la lisozima y su presencia en varios exudados naturales (lágrimas, mucosidades, etc..).



Figura 1. Placa de Petri con las colonias y el hongo *penicillium*

Como este compuesto no resultó suficientemente activo como agente terapéutico, continuó sus ensayos y así fue como se encontraba en 1928 sembrando esas mismas bacterias en una caja de Petri, pero se fue de vacaciones y se las olvidó. A su regreso dos semanas más tarde la placa mostraba, además de las colonias esperables, la presencia de un hongo invasor. ¡Se había contaminado el experimento! En lugar de tirar su placa a la basura, se puso a observarla (Fig. 1). Alrededor del hongo ¡no había colonias! y sólo en los lugares más remotos al hongo estaban las colonias. Sospechó que del hongo debía difundir una sustancia inhibitoria. Así fue como se descubrió el primer antibiótico (AB), y se lo nombró Penicilina por el hongo *Penicillium notatum* (y luego *P. chrysogenum*), productores de dicho compuesto. Pero son los trabajos posteriores realizados por Howard Florey y Ernst Chain los que permitirán purificar la

penicilina. Su enorme perfil terapéutico solo se pondrá en marcha durante la segunda guerra mundial. Fueron las necesidades de combatir las numerosas infecciones generadas por las mutilaciones las que impulsaron a la industria farmacéutica, principalmente en EE.UU (Eli Lilly, Pfizer Squibb, Merck, Lederle), y a las instituciones académicas a emprender el estudio de esta sustancia. Se habló del mayor milagro y se salvaron millones de vidas. En 1945, la Academia Sueca galardonó con el Premio Nobel de Medicina a sus tres importantes descubridores (Fleming, Chain y Florey) (Fig. 2).



Figura 2. Los Premios Nobel 1945 A. Fleming, E. Chain y H. Florey

1940 - 1970 ha sido el periodo de oro del descubrimiento de nuevos antibióticos, ya sean naturales o sintéticos (Fig. 3). La desaceleración observada desde entonces (Fig. 4) se debe a varios factores, entre los cuales el más importante es la falta de inversión de la industria farmacéutica, desalentada por la rapidez con la cual cada nuevo antibiótico pierde su eficacia (ver resistencias a AB) (23 32). Los blancos de acción de los AB tienen que ver con la estructura y el metabolismo particular de las bacterias (células procariontas) que determinan su especificidad.

Año de introducción	Tipo de droga
1935	sulfonamidas
1941	penicilinas
1945	cefalosporinas
1944	aminoglicósidos
1949	cloramfenicol
1950	tetraciclinas
1952	Macrólidos / lincosámidos estreptograminas
1956	glicopéptidos
1957	rifamicinas
1959	nitroimidazoles
1962	quinolonas
1968	trimetoprim
2000	oxazolidinonas
2003	lipopéptidos

Figura 3. Antibióticos descubiertos entre 1935 y 2003

Antibióticos aprobados entre 1983 y 2004

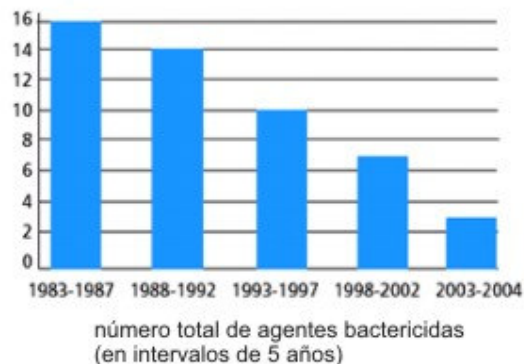


Figura 4: Nuevos agentes bactericidas en el periodo 1983 y 2004

Cómo y cuándo actúan

Blanco de acción

Los AB se agrupan de acuerdo a su blanco de acción aunque no compartan una estructura química similar. Algunos actúan sobre la síntesis de las envolturas bacterianas, membrana o pared (beta-lactámicos, glicopéptidos, polimixinas...) otros sobre el proceso de replicación del ADN

(quinolonas...), de transcripción (rifampicina...), el aparato de biosíntesis de proteínas (tetraciclinas, eritromicina, lincomicina, estreptomicina, cloranfenicol...) o sobre el metabolismo (sulfamidas) (fig.5). A su vez, para su actividad requieren que las bacterias se encuentren en división activa y que el antibiótico encuentre su blanco.

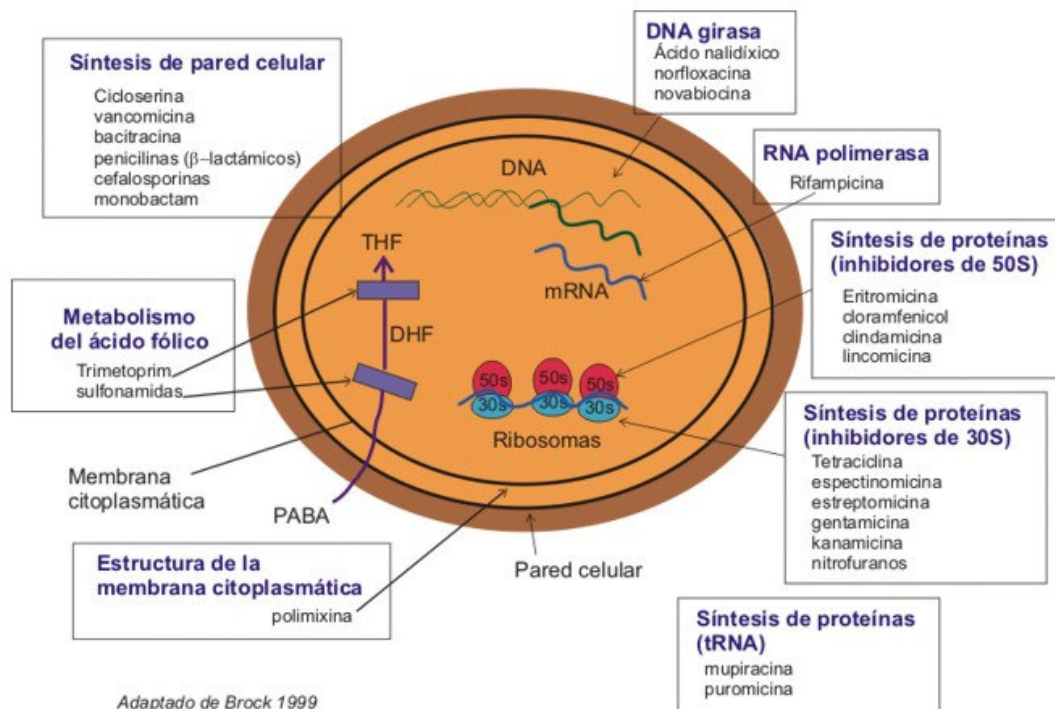


Figura 5. Tipos de AB y su blanco. (Brock 1999)

Pero las bacterias no se quedan quietas frente al AB y pueden desarrollar todo una serie de procesos (ver resistencias a AB) que le permiten inhibir su ingreso o excretarlo, modificar al AB para que pierda eficiencia o alterar el blanco. Durante mucho tiempo una alternativa desarrollada por la Industria farmacéutica ha sido la de ir modificando al AB cada vez que aparecía alguna de estos efectos adversos. Ese ha sido el caso de la penicilina y sus derivados β -lactámicos.

La penicilina y sus derivados: ping-pong entre antibióticos y resistencias bacterianas

La penicilina tiene un anillo β -lactámico (fig.6) gracias al cual compite con el sustrato natural de las enzimas PBPs (penicillin-binding proteins), responsables de la síntesis de la pared celular (peptidoglicano) (Fig.7). Su presencia hace que la nueva pared pierda el rol de contenedor de la estructura celular, lo que permite el ingreso descontrolado del agua y la lisis de la bacteria.

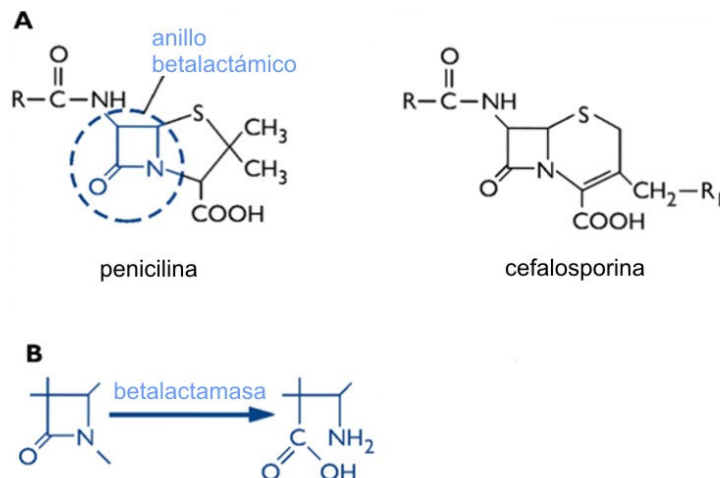


Figura 6.
 A- Estructura química de las diferentes familias de AB β -lactámicos
 B- blanco de las β -lactamasas

En bacterias Gram positivas (como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus*) la pared se encuentra inmediatamente accesible y constituye un blanco ideal, de ahí su eficacia. Esto no ocurre en bacterias Gram negativas, donde la pared es mucho menor y se encuentra entre 2 membranas (*Enterobacterias*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Serratia* etc..) las que impiden su acceso al blanco (fig. 7).

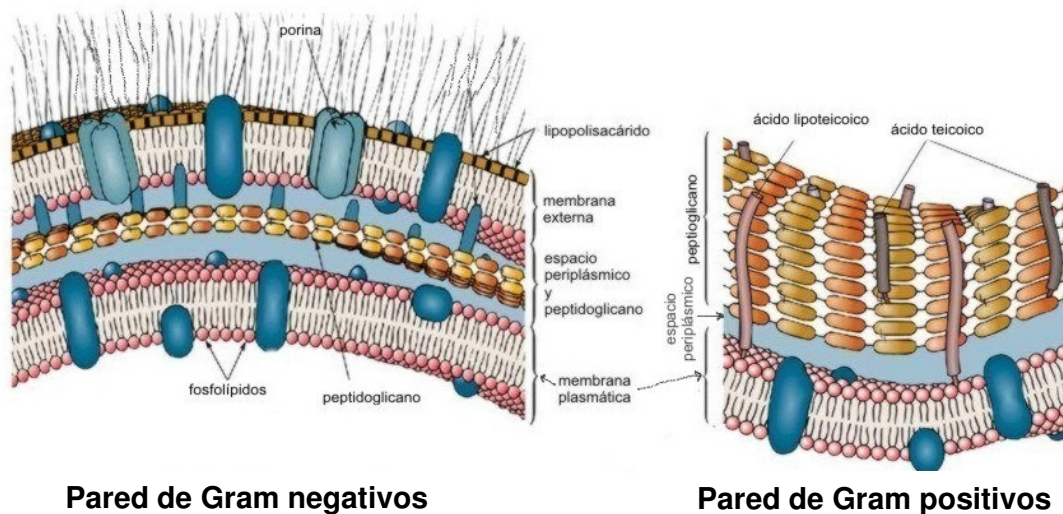


Figura 7. Estructura de las envolturas de Bacterias Gram + y Gram-

Esta deficiencia se contrarrestó produciendo por síntesis química un derivado de la penicilina capaz de atravesar la capa lipídica y ser eficiente en infecciones producidas tanto por bacterias Gram+ como Gram- (Ej. cefalosporinas). Sin embargo, con su uso estos compuestos se tornaron ineficaces, pues algunas bacterias producen una enzima asociada a la pared (β -lactamasa) que rompe el anillo β -lactámico e inactiva la penicilina y sus derivados. De nuevo la industria química consiguió modificar

la estructura del AB de forma tal que sea resistente a la actividad de las β -lactamasas (Ej Amoxicilina, ampicilina) o que la inactive (clindamicina). Esta última generación de AB también tiene la ventaja de soportar sin degradarse el tránsito por la acidez del estómago cuando se administran por vía oral.

La historia no termina ahí, pues pronto se han puesto en evidencia las resistencias múltiples a antibióticos agenciadas por los sistemas eficientes de eflujo para arruinar el panorama. Es así como la vigencia de un antibiótico viene menguando en forma alarmante: mientras la penicilina G conservó su eficacia de 1944 a 1970 aproximadamente, los AB de última generación solo resisten unos cinco años o menos frente a la aparición de las temidas resistencias (Fig. 8). Como ejemplo, entre 1980-1990 la cantidad de infecciones con cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a AB pasó de 0,1% al 10%. (3, 6, 17, 20, 21)

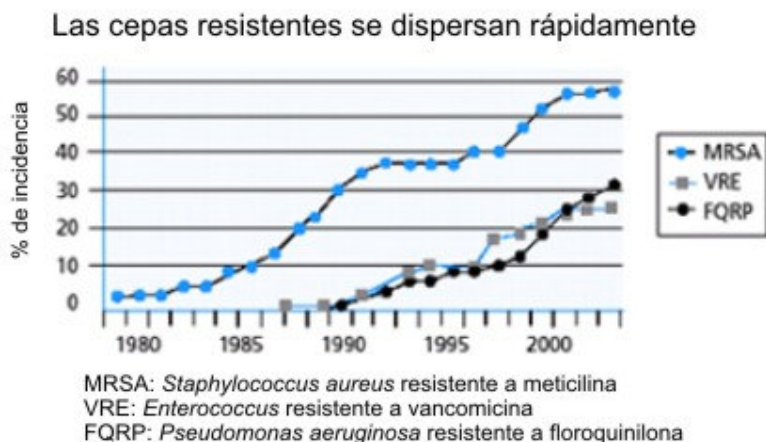


Figura 8. Frecuencia de aparición de bacterias ABR en función del uso de AB.

Las estructuras que impiden su camino al blanco

El acceso del AB a su sitio de acción no es un problema menor, pues como cualquier compuesto orgánico o iónico, excepto el agua, su acceso al blanco requiere sortear la barrera de las envolturas bacterianas. De ahí que muchos de los antibióticos más eficientes tienen su blanco en las envolturas. Este es el caso de las penicilinas (primer AB), vancomicina (AB de último recurso), y en la actualidad sigue siendo un polo importante de investigación. Pero además de las estructuras clásicas de envoltura descritas, muchos microorganismos desarrollan envolturas adicionales (S-layers, cápsulas, biopelículas o matrices de exopolisacáridos, de ácidos mucólicos etc...) que impiden el ingreso de los AB. Estas estructuras a su vez no se desarrollan siempre en condiciones de laboratorio, pero sí en los procesos infecciosos (*Pseudomonas aeruginosa* y fibrosis quística, *Bacillus anthracis* y ántrax etc...) y explican la ineficiencia de los AB en algunas situaciones.

Otro aspecto importante de los AB es que no todos terminan matando y lisando a las bacterias (acción bactericida y bacteriolítico como la penicilina), algunos sólo impiden su crecimiento (acción bacteriostática).

Esto permitió clasificar a los AB en dos grandes grupos:

Bactericidas	Bacteriostáticos
<ul style="list-style-type: none"> • Beta-lactámicos (Penicilinas y cefalosporinas) • Glicopéptidos (Vancomicina..) • Aminoglucósidos (Estreptomina...) • Quinolonas (norfloxacino, ácido nalidixico...) • Polimixinas 	<ul style="list-style-type: none"> • Macrólidos (Grupo eritromicina) • Tetraciclinas • Cloranfenicol • Clindamicina, Lincomicina • Sulfamidas

Por su eficiencia, muchos de los AB bacteriostáticos son paulatinamente eliminados, como en el caso del cloranfenicol.

AB y reacciones adversas

En principio los AB no interfieren con el normal desarrollo de las células u órganos animales. Sin embargo todos presentan cierta toxicidad. Se utilizan solo aquellos cuyo beneficio es superior a los inconvenientes que puedan ocasionar. Esta decisión se toma evaluando el índice de toxicidad selectiva.

Los antibióticos pueden provocar efectos adversos en el organismo, algunos de estos efectos son:

Alergia. Muchos antibióticos producen erupciones en la piel y otras manifestaciones de alergia (fiebre, artritis, etc), en un pequeño número de personas predispuestas. El choque anafiláctico es una reacción extrema que se observa tanto por el uso del AB por si mismo (penicilinas), como por el excipiente que lo acompañan.

Disbacteriosis. Al eliminar también bacterias "buenas" (de presencia deseable en el tubo digestivo) pueden producir dolor y picor en la boca y la lengua, diarrea, etc.

Sobrecrecimientos. Los antibióticos eliminan unas bacterias pero permiten que crezcan otras bacterias (se seleccionan las resistentes y/o se varía la composición normal de la flora) o predisponen el terreno para el crecimiento de hongos (caso de candidiasis).

Resistencias. Las bacterias intentan hacerse resistentes rápidamente a los antibióticos, y la administración continua o repetida de antibióticos para enfermedades menores favorece la aparición de estas resistencias.

Toxicidad. Los antibióticos pueden dañar los riñones, el hígado y el sistema nervioso, y producir alteraciones en los glóbulos de la sangre.

¿Qué son las resistencias y cómo se generan?

Las bacterias tienen una capacidad de división muy eficiente: dependiendo de las condiciones y del medio pueden dividirse en 20 min o hasta cada 100 días y más. En los procesos infecciosos, las bacterias se encuentran en activa división y se pueden contar hasta 10^9 /ml. Estas dos condiciones hacen que se encuentren en el mejor escenario para que los mecanismos de variación genética operen eficientemente. Mutaciones en el genoma del huésped o en algún elemento asociado (plásmido, profago, etc.) eliminan la capacidad de transportar al AB, destruyen u modifican al AB, lo expulsan de la célula, o bien modifican al blanco (Fig 9). En cuanto a la posibilidad de transferir esta nueva capacidad, disponen de varios mecanismos (Fig. 10) entre los cuales los más conocidos son:

- la conjugación entre microorganismos emparentados o no, donde la presencia de plásmidos conjugativos promiscuos portadores de resistencias es un buen aliado
- la transducción mediada por bacteriófagos
- la transformación donde la simple lisis libera el ADN que será captado por una bacteria receptora sin demasiadas restricciones, al menos a este nivel.

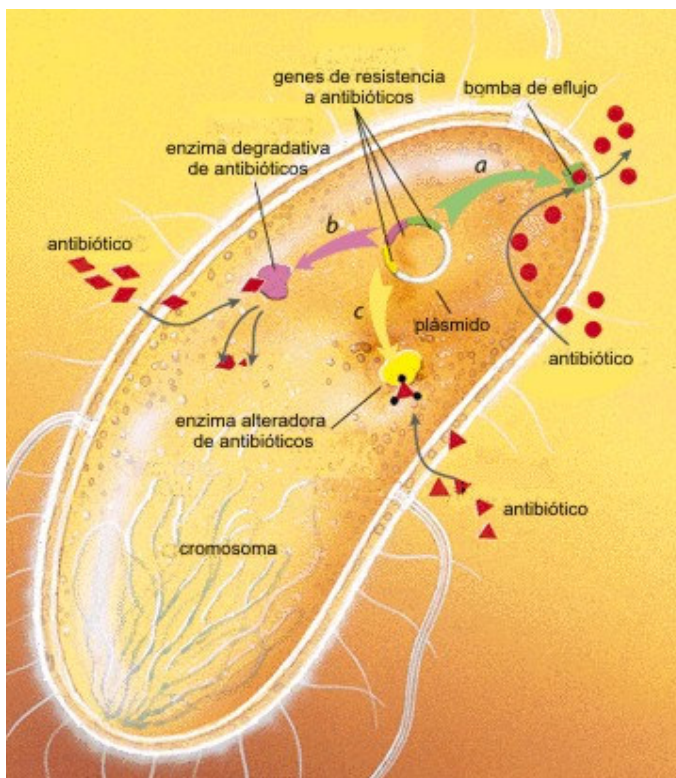


Figura 9. Mecanismos de resistencia a los AB (Levy S. 1998)

Todos son utilizados y contribuyen a diseminar las ABR. Solo falta que el paciente los ayude. A los fines de que estos "individuos" sean seleccionados, bastará con que no se haya efectuado una destrucción total y rápida de las bacterias patógenas o de que se haya utilizado previamente en muchas ocasiones ese mismo AB.

Por otro lado, las resistencias a AB se encuentran con mucha frecuencia asociadas a estructuras como transpones y plásmidos o las dos a la vez. El primer plásmido de resistencia fue aislado en Japón en 1957 (fig. 11) y tiene todas estas características. Es importante remarcar que es un plásmido conjugativo promiscuo, capaz de transferirse entre especies no emparentadas; las resistencias se encuentran entre elementos transponible (IS o Tn) con lo cual

saltarán la barrera de la recombinación homóloga y se pasearán dentro de bacterias muy diferentes. Estos elementos pueden además pasar de una ubicación inestable (plásmido ó fago) hacia una más estable (genoma bacteriano) (figura 10). Esto implica, además de estabilidad, poder adquirir las resistencias 100 a 1000 veces más eficientemente que por simple mutación y de paso adquirir varias a la vez. Estas estructuras se pueden trasladar con alta frecuencia entre sus congéneres, y lo que es peor, hacia otras bacterias no tan emparentadas como pueden ser los habitantes normales y necesarios de la flora intestinal. Estos se convierten en el reservorio de dichas resistencias e inocente *partenaire* listo para dotar al próximo patógeno invasor con una artillería de resistencias.

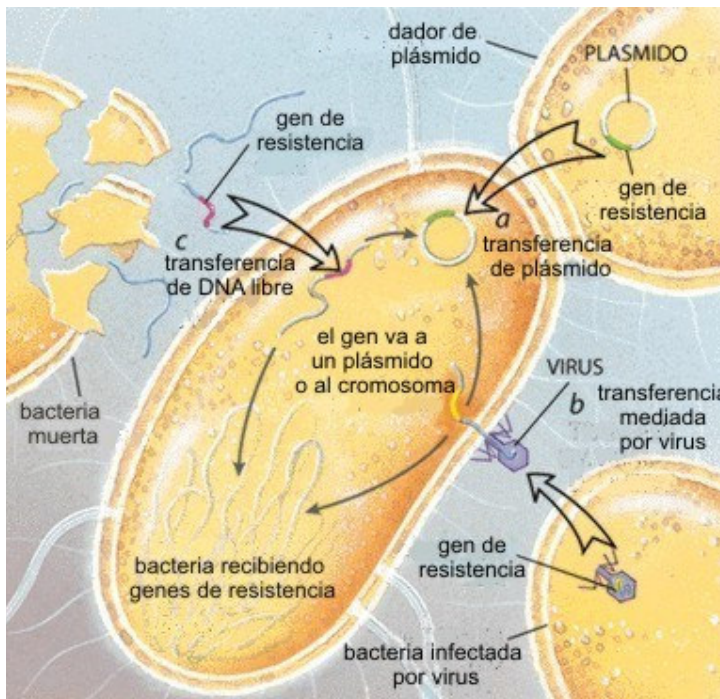


Figura 10. Mecanismos de Transferencias de Resistencias a AB Levy S. 1998

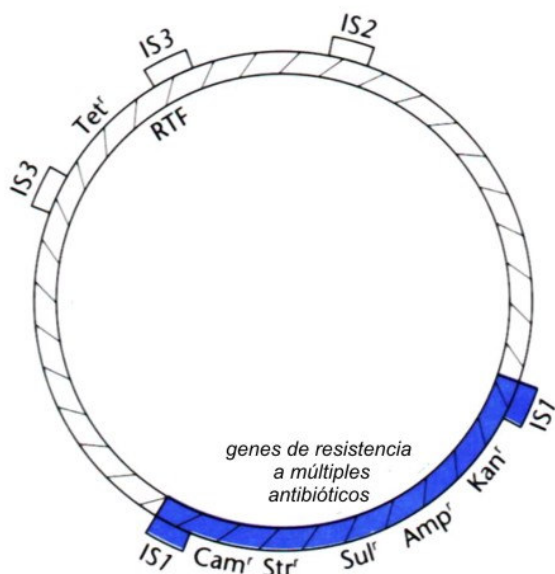


Figura 11. Primer Plásmido multiresistente R1 o NR1, aislado en Japón en 1957

Por supuesto, plásmidos con similares características se aíslan permanentemente en cualquier huésped, y lo que es peor, de los hospitales, donde son un reservorio temido y son responsables de las famosas infecciones hospitalarias. Por si esto fuera poco, ahora se sospecha que el uso de los “simples desinfectantes” puede contribuir al aislamiento de bacterias resistentes, pero con un nuevo panorama: aumentan la eficiencia de los sistemas de detoxificación inespecíficos (bombas de eflujo multi valentes o *multi efflux pump*) (figura 12). Al mutar en un solo paso, pueden volverse más eficaces para que la bacteria se haga resistente a varios tipos y familias de antibióticos que podrían haber permitido una lucha más equitativa (1, 3, 10, 11, 24). Se podría llegar a pensar que el AB creó la resistencia, pero igual que el órgano no

crea la función, las estructuras genéticas responsables ya se encuentran presentes y solo necesitan “adaptarse” y encontrarse en el buen lugar en el buen momento. El AB solo sirve para seleccionar esos eventos y esas “raras” bacterias. De lugares aislados y donde no hubo contacto con antibióticos, se han aislado bacterias resistentes ¡incluso para AB sintéticos!.

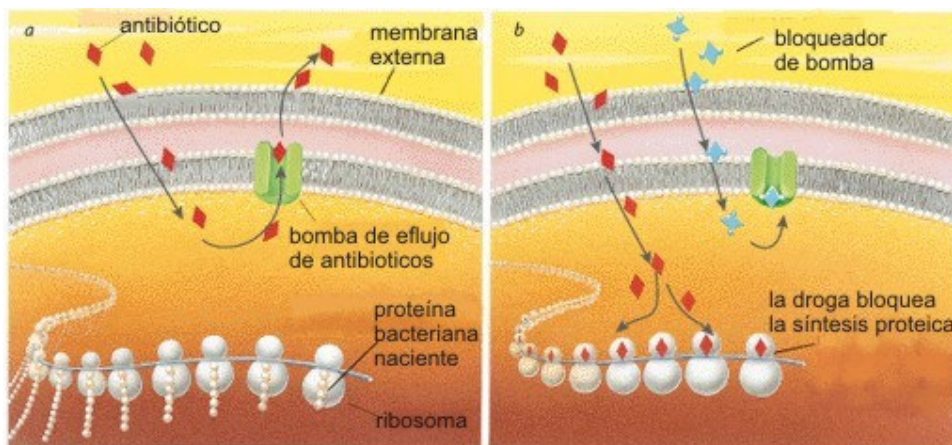


Figura 12. Sistemas de eflujo del AB, Levy S. 1998

Uso y abuso

Las infecciones respiratorias por neumococos son una de las infecciones más comunes en pediatría; ya en 1960 empezaron a aparecer cepas resistentes a penicilina. En 1980 tanto España como Hungría y Sud-África dieron señales de alarma, pues en más del 50% de los casos las cepas eran resistentes. Así fue como en Hungría los pediatras decidieron evitar su administración. Entre 1983 y 1992 se observó que las resistencias a AB en las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* bajaron del 50% al 34%. Este resultado indica que es posible revertir la situación, pues las cepas portadoras

de resistencias utilizan parte de su energía al mantenimiento de dichas funciones, con lo cual su tasa de división es menor. En ausencia del AB se ven favorecidas aquellas que no mantienen esta propiedad, las capaces de crecer más rápidamente, o sea, las cepas sensibles al AB.

Actualmente se recetan aproximadamente 200 millones de antibióticos al año en Estados Unidos. Se estima que la mitad de estas prescripciones son inapropiadas debido a que el origen de la infección es viral. Además su uso ayuda a seleccionar a las resistentes de entre nuestras buenas bacterias saprofitas, con todo lo que ello implica para el futuro.

La aparición de cepas patógenas resistentes a AB es proporcional al uso de estos: entre 1980-1990 se utilizaron cerca de cuatro toneladas de gentamicina y resultó que cerca del 4% de las bacterias patógenas se volvieron resistentes. En ese mismo periodo se administró cerca de 100 toneladas de ampicilina y ahora el 70% de las infecciones perdieron su sensibilidad a dicho AB.

- El abuso de antimicrobianos en los hospitales como medida de profilaxis en las operaciones quirúrgicas está incrementando la resistencia antimicrobiana sin realmente beneficiar en muchos casos al paciente.

- Existe una tendencia a utilizar antibióticos de amplio espectro para combatir infecciones menos graves, lo que puede disminuir *a posteriori* la posibilidad de su uso en infecciones más virulentas y también reacciones tóxicas. Se siguen recetando las tetraciclinas para combatir infecciones que podrían ser tratadas más eficientemente con otros antibióticos menos tóxicos, y con un espectro más limitado.

- Muchos antibióticos se recetan sin identificar al microorganismo o realizar antibiogramas, incluso cuando dichos ensayos están claramente aconsejados.

- Normalmente se recetan los antibióticos más caros cuando otros más baratos son igual de efectivos. Dentro de los antibióticos más caros están las cefalosporinas y algunas tetraciclinas

- Muchas personas se automedican antibióticos. No es aconsejable dispensar antibióticos sin receta médica.

- **Los tratamientos incompletos**, donde el paciente abandona al AB por... Los efectos de esta práctica implican que se seleccionen ahora patógenos resistentes. Y solo hay que esperar que se multipliquen suficientemente para provocar los trastornos iniciales y de vuelta...

- **Los animales de uso en nuestra alimentación** han sido sospechados de constituir una fuente importante de bacterias resistentes. Se les administran AB tanto para el engorde (pollos, vacunos etc...) como para evitar que contraigan infecciones, con lo cual estos animales-alimento se convierten en portadores de bacterias resistentes a AB. Es así como se han podido detectar patrones plasmídicos con ABR en cepas aisladas de estos animales, cuyo perfil es muy semejante al que se encuentra en los humanos que los comieron. Esto indujo a que se analice la posibilidad de reglamentar su uso, como se muestra en el recuadro.

Extraído del INFORME DE LA REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS BIOLÓGICAS DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL: París, 25–27 de enero de 2006

En varios países algunos antimicrobianos (por ejemplo, cloramfenicol, nitroimidazol y nitrofurán) están totalmente prohibidos para el uso veterinario y para el uso en animales de abasto con fines terapéuticos o para estimular el crecimiento. Algunos países han prohibido totalmente los antimicrobianos como estimuladores del crecimiento y los restringen a la utilización terapéutica o profiláctica.

En algunos casos muy específicos y cuando no hay alternativa, algunos Países Miembros de la OIE autorizan la utilización de antimicrobianos restringidos, por ejemplo, rifampicina combinada con eritromicina, que puede ser permitida para tratar la infección por *Rhodococcus equi* en los potros. Cabe destacar que la importancia que tiene la utilización de los antimicrobianos depende del país.

- **En agronomía**, muchas enfermedades de los vegetales son de origen bacteriano y responden a los tratamientos por AB. Pero los inconvenientes son similares a los ya descritos: además, se agrega el inconveniente no solo de entrar en la cadena alimenticia pero también de quedar *in situ* y de poder

alcanzar la capa acuífera. En este caso también se nota la preocupación de las autoridades competentes como se desprende del siguiente informe resumido:

Guía de principios en el uso de antibióticos según: National Health y Medical Research Council 24/3/2005

- minimizar su uso
- restringir a áreas cuya producción agrícola se vea afectada si no se usa
- cuando no haya otra alternativa
- evaluar y reducir los riesgos de sus uso en la aparición de AB^R tanto en animales como humanos
- al AB debe degradarse rápidamente en el medio ambiente ya sea química o microbiológicamente
- no usar en casos innecesarios o cuando hay otras alternativas
- cuando la tasa de aparición de AB^R es alta utilizar junto con otro AB a fin de disminuir la incidencia.

En ambos casos todo parece indicar que de momento solo hay alerta en cuanto a la necesidad de establecer regulaciones y que estas son muy dispares según los países. Las medidas dependerán del conocimiento de la "realidad" en cada país y de la presión que ejerzan las poblaciones en las instituciones responsables del control.

En cuanto a la introducción de genes de ABR en plantas transgénicas, hasta el momento hubo consenso y reglas internacionales para eliminar los genes de resistencia AB que sirvieron en los pasos de construcción.

- Necesidad de determinar el estado y forma de crecimiento del microorganismo a combatir:

Los AB son más eficaces en bacterias dividiéndose activamente y menos eficaces en bacterias en reposo o formando quistes, cápsulas o biopelículas (ej.: fibrosis quística, placa dental etc... De ahí, la necesidad de determinar el estado de crecimiento *in situ* y de atravesar o eliminar la (s) barrera (s) con algún otro agente específico.

Alerta -->la determinación de la susceptibilidad de un microorganismo al AB en el laboratorio puede ser muy diferente de su efectividad *in vivo*. Si es posible se debe corroborar su eficiencia en las condiciones más relacionadas al estado de crecimiento en el lugar de la infección.

¿Qué estrategias utilizar?

- Utilizar AB solo en caso necesario y asegurarse de que se trata de una infección bacteriana.
- Efectuar antibiogramas del microorganismo siempre que sea posible
- No interrumpir un tratamiento una vez iniciado.
- Evitar los AB de última generación a fin de resguardarlos para su uso en casos extremos
- Averiguar el estado de crecimiento del microorganismo (activo o estacionario, crecimiento planctónico versus *biofilms*, presencia de cápsulas, S-layers etc..)
- Evitar por un tiempo su uso a fin de eliminar la carga de bacterias resistentes

- **Atención: Algunas toxinas son liberadas cuando se lisan las bacterias (ejemplo: botulismo). Esto implica que en esos casos el AB se debe manejar con suma precaución, y administrar junto con un una antitoxina.**

Se ha observado presencia de daño tisular como consecuencia del tratamiento antibiótico, que provoca **lisis bacteriana** y exacerbación de la respuesta.

En el botulismo del lactante no deben administrarse antimicrobianos ya que la destrucción de las formas vegetativas a nivel intestinal provocan una liberación de toxina y empeora el cuadro

Nuevos compuestos, nuevos horizontes. La batalla continua

1- Compuestos de origen vegetal

Los antibacterianos de origen microbiológico parecen haber agotado sus posibilidades en esta lucha; sin embargo, desde las plantas o árboles, ya sean terrestres o acuáticas, se han identificado compuestos con diferentes actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas etc. que constituyen un importante reservorio. Distintos tipos de extractos y aceites han sido utilizados a lo largo de la historia en forma empírica y constituyen la base de numerosas terapias homeopáticas. Actualmente numerosos laboratorios de investigación se dedican a ellos y podrían ser fuente de novedosos antibacterianos (22, 25).

2- La Genómica permite diseñar nuevas estrategias

A partir del análisis de la secuencia genómica de las bacterias, no solo se puede intuir con cuántos genes y cuántas proteínas puede contar determinado microorganismo, sino también cuáles son esenciales para vivir, al menos, en condiciones de laboratorio. Así se puso en evidencia que muchos de los genes que tienen que ver con la síntesis de envolturas son esenciales y no tanto los genes regulatorios; que serían una exquisitez para no malgastar energía.

Del análisis de las proteínas esenciales y de su posible configuración (11, 13, 15, 27), se pueden “diseñar” nuevos antibióticos (11, 14, 18). Las envolturas siguen siendo el blanco preferido (21, 22). Ese ha sido también el blanco de un nuevo antibiótico recientemente caracterizado producido por *Streptomyces platensis* cuya novedad consiste en afectar la síntesis de los ácidos grasos que componen la membrana (34).

Otra alternativa evaluada por estudios recientes donde es importante conocer más de la genómica de la bacteria a eliminar, ha sido la de limitar la capacidad mutagénica interfiriendo con los genes responsables de sus mecanismos de reparación (6).

3- Péptidos animales, bacterias devoradoras de otras bacterias etc... ¿hacia nuevas formas de antibacterianos?

Defensinas, dermicinas, lisozima, lactoferrina (bactericida, antiviral y anti-inflamatorio inhibidor de formación de biopelículas en *Pseudomonas*), surfactinas etc. son proteínas, péptidos o lipopéptidos naturales que el organismo pone en funcionamiento para mantener a raya la multitud de posibles agentes infecciosos con los cuales debe convivir (12). Estos constituyen un campo a explorar. Algunos de ellos ya son conocidos y son considerados como posibles alternativas, pero requieren estudios más exhaustivos en cuanto a eficacia, espectro de acción, especificidad, toxicidad etc. (14, 26, 28, 30).

También algunas bacterias sintetizan péptidos o proteínas capaces de eliminar, por diferentes mecanismos, a sus semejantes (bacteriocinas). Estos compuestos son específicos y actúan en bacterias emparentadas con las productoras. Se utilizan esencialmente en la industria alimenticia, donde algunas especies bacterianas como los Lactobacilos, son requeridas por sus propiedades benéficas (probióticos, prebióticos) y donde se requiere eliminar otras especies no deseables en el alimento (9). Es del conocimiento de estos factores, y de su posible ampliación que pueden provenir nuevas alternativas. Estas constituyen un polo atractivo de investigación cuyas aplicaciones se vislumbran en un futuro próximo.

Otro nuevo polo de interés lo constituyen el grupo de bacterias depredadoras. Estas bacterias han sido durante mucho tiempo una curiosidad, pues son capaces de encontrar un huésped adecuado al que “fagocitan” y destruyen. Últimamente su actividad bactericida ha despertado gran interés, pues

las bacterias embestidas al ser atacadas por múltiples vías no desarrollan resistencias. Además, estas depredadoras no comparten ninguna similitud genética con su huésped. Hasta el momento solo se conocen las que atacan a bacterias Gram negativas. Lo que las hace más atractivas es la capacidad de atacar algunos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, de difícil tratamiento, ya que suelen crecer dentro de una bio-película, pero ésta no constituye una barrera para las depredadoras, con lo cual serían buenos bactericidas ahí donde los AB fallan (16).

4- Fagos: los olvidados y re-descubiertos luchadores.

Los fagos o virus bacterianos destruyen a la bacteria que los hospedó después de haberse reproducido ampliamente. Esta propiedad condujo a varios microbiólogos a pensarlos como posibles bactericidas. Fue el canadiense Félix D'Herelle (el que les dio el nombre de bacteriofagos por "comen bacterias") a quien se le debe el mérito de haber pensado en su utilidad y proponer usarlos como agentes terapéuticos (1930-40). La revolución que generó el uso de la penicilina y de los AB en general, así como la posición de algunos investigadores de peso y renombre como Gunther Stent (29), desalentaron continuar en Occidente con esta vía de estudios y desarrollo. Esto condujo a que durante casi 40 años sólo en los países del Este, y en particular en la URSS, se prosiguiera con ese campo terapéutico. Así se generó en los años 1930 en Tbilisi (Georgia) el primer centro donde llevar a cabo este proyecto, y solo en 1982 apareció en Canadá el "Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Virus". Actualmente la utilización de fagos es un campo en plena exploración en todo el mundo por diferentes motivos, tanto básicos como aplicables. Son una herramienta genética de fácil uso, no presentan toxicidad alguna, pueden ser útiles para insertar epitopos antigénicos en sus envolturas: Por otro lado son una muy buena alternativa a los AB: son específicos de especie, lisan las bacterias susceptibles en menos de 1 hora, se pueden aplicar directamente en la piel o ingerir sin que se destruyan en el tubo digestivo (algunos reconstituyentes de flora intestinal los incluyen), aumentan su número en forma exponencial cuando encuentran a su blanco (amplificación del bactericida). Son pocos los restos celulares que quedan. Su inconveniente sigue siendo la liberación de toxinas por lisis, cuando ésta es el factor de virulencia. Pero todo es cuestión de rapidez (7, 8, 16, 19, 35)

Como podemos ver, queda abierto todo un panorama de posibilidades en cuanto a nuevas formas de antibacterianos. En este momento es del aprendizaje de los mecanismos de invasión y de respuesta del huésped que se vislumbran nuevas alternativas. Los fagos son una buena opción pero requieren mayor investigación. Igualmente tenemos que estar preparados a que nada en este campo es para siempre. Pero siempre es posible explorar nuevas direcciones que "casualmente" vienen de la mano del conocimiento.

Bibliografía consultada:

http://www.bbc.co.uk/history/historic_figures/fleming_alexander.shtml

<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/penicill.htm#Penicillin:%20the%20story%20of%20an%20antibiotic>

1. Andersson DI, 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5): 452-456.
2. Appelbaum PC and Jacobs MR, 2005. Recently approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 8(5): 510-517
3. Ash C, 1996. Antibiotic resistance: The new apocalypse? *Trends in Microbiology*, 4 (10): 371-372.

4. Barrett JF, 2005. Can biotech deliver new antibiotics? *Current Opinion in Microbiology*, 8(5): 498-503.
5. Brock T D, Madigan M T, Martinko J M, Parker J. *Biology of microorganims* 6th edition, Prentic-Hall Inc. USA, 1999, x-909
6. Cirz RT, Chin JK, Andes DR , de Crécy-Lagard V, Craig WA, Romesberg FE, 2005. Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance. *PLOS Biology* 3(6): 1024-1033.
7. Clark JR and MarchJB, 2004. Bacterial viruses as human vaccines? *Expert Rev Vaccines*. 3(4): 463-76.
8. Clark JR and MarchJB, 2006. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology*. 24(5): 212-8.
9. Cotter PD, Hill C and Ross PR, 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3, 777-788
10. Davison HC, Low JC and Woolhouse MEJ, 2000. What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends in Microbiology*, 8 (12): 554-559.
11. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD, 2006. Sampling the Antibiotic Resistome. *Science*. 311(5759): 374 – 377
12. Dziarski R and Gupat D, 2006. Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins. *Cellular Microbiology* 8(7): 1050-1069
13. Freiberg C, Brötz-Oesterhelt H and Labischinski H, 2004. The impact of transcriptome and proteome analyses on antibiotic drug discovery. *Current Opinion in Microbiology*, 7(5): 451-459.
14. Hiemstra PS, Fernie-King BA, McMichael J, Lachmann PJ, Sallenave JM, 2004. Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity as templates for the development of novel anti-infective and for immune therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* 10 (23): 2891-905.
15. Hugues D, 2003. Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nat Rev Genet.* 4(6): 432-41.
16. Kadouri D and O'Toole GA, 2005. Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* attack. *Appl Environ Microbiol.* 71(7):4044-51.
17. Levy S, 1998. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* 278 (3):46-53.
18. Lin TW, Melgar MM, Kurth D, Swamidass SJ, Purdon J, Tseng T, Gago G, Baldi P, Gramajo H and Tsai SC, 2006. Structure-based inhibitor design of AccD5, an essential acyl-CoA carboxylase carboxyltransferase domain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl Acad Sci NY* 103: 3072-3077.
19. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fijieda M, Wakiguchi H and Imai S, 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infections diseases. *J. Infect Chemother* 11: 211-219
20. Monroe S and Polk R, 2000. Antimicrobial use and bacterial resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 3(5): 496-501
21. Nikaido H, 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology*, 1(5): 516-523.
22. Pereira EM, Machado Tde B, Leal IC, Jesus DM, Damaso CR, Pinto AV, Giambiagi-deMarval M, Kuster RM, Santos KR, 2006. *Tabebuia avellanadae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and in vivo dermal irritability analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* Mar 22; 5:5.

23. Projan SJ, 2003. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Current Opinion in Microbiology*, 6(5): 427-430.
24. Recchia GD and Hall RM, 1997. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends in Microbiology*, 5(10): 389-394.
25. Rios JL, Recio MC, 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 100:80-84
26. Rogan MP, Geraghty P, Greene CM, O'Neill SJ, Taggart CC and McElvaney NG, 2006. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respir Res.* 7(7): 29.
27. Silver LL, 2003. Novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5): 431-438.
28. Sitaram N, 2006. Antimicrobial Peptides with Unusual Amino Acid Compositions and unusual Structures. *Current Medicinal Chemistry*, 13: 763-771.
29. Stent G. *Molecular genetics.* WH Freeman & Co., San Francisco USA 1970
30. Sutcliffe JA, 2005. Improving on nature: antibiotics that target the ribosome. *Current Opinion in Microbiology*, 8(5): 534-542.
31. Teuber M, 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5): 493-499.
32. Thomson CJ, Power E, Ruebsamen-Waigmann H y Labischinski H, 2004. Antibacterial research and development in the 21st Century – an industry perspective of the challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 7(5): 445-450
33. Thomson JM and Bonomo RA, 2005. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril! *Current Opinion in Microbiology*, 8(5): 518-524
34. Wang J et al. 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature*, 441: 358-361
35. Yacoby I, Shamis M, Bar H, Shabat D and Benhar I, 2006. Targeting antibacterial agents by using drug-carrying filamentous bacteriophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2087-2097

* La Doctora Carmen Sánchez Rivas es Profesora Asociada de Microbiología e Investigadora Principal del CONICET.

Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina decarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*.

I.D.Algranati, M.P.Serra, C.Carrillo y N.S.González.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires-Fundación Instituto Leloir

Av. Patricias Argentinas 435, Buenos Aires (C1405BWE)

E-mail: ialgranati@leloir.org.ar

Recibido: 24/07/2006

Aceptado: 9/08/2006

RESUMEN

El protozoario *Trypanosoma cruzi* es el agente causante de la enfermedad de Chagas que afecta a millones de personas en Latino América. Muchos estudios sobre la bioquímica y biología molecular de este parásito intentan investigar las posibles diferencias entre los caminos metabólicos utilizados por el protozoario y por las células de los hospedadores mamíferos, con el propósito de detectar blancos potencialmente aptos para el diseño de quimioterapias antiparasitarias. El metabolismo de poliaminas es un buen candidato pues presenta propiedades únicas en *Trypanosoma cruzi*.

Las poliaminas son un grupo de sustancias básicas de bajo peso molecular que están presentes en prácticamente todos los organismos vivos y cumplen múltiples funciones esenciales tanto en la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas como en la proliferación y diferenciación celular. La inhibición de la biosíntesis de poliaminas es una de las estrategias más adecuadas en la búsqueda de drogas antiproliferativas eficientes. Las concentraciones endógenas de poliaminas en células de mamíferos están reguladas por mecanismos de retroinhibición e interconversión que pueden contrarrestar el bloqueo del metabolismo de dichas sustancias en las células mencionadas. Contrariamente, los protozoarios *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y diferentes especies de *Leishmania* tienen un metabolismo de poliaminas más simple y carecen de capacidad para regularlo. Esto explica la dependencia de los parásitos del transporte de poliaminas desde el medio externo. Por otra parte el compuesto bis-glutacionil espermidina (tripanotiona), un cofactor esencial para mantener el equilibrio intracelular de óxido-reducción, se ha encontrado exclusivamente en protozoarios tripanosomátidos y este hecho también contribuye al efecto selectivo antiparasitario de algunas drogas que inhiben la biosíntesis de poliaminas. *Trypanosoma cruzi* es el único organismo eucariótico incapaz de sintetizar poliaminas "de novo" pues carece de las decarboxilasas de ornitina y arginina que son las enzimas que catalizan el primer paso de los dos posibles caminos metabólicos en la síntesis de poliaminas. Investigaciones de nuestro laboratorio han demostrado que la carencia mencionada no se debe a factores inhibitorios del medio interno del parásito sino a la ausencia de los genes correspondientes en el genoma de *T. cruzi*. Por esta razón el protozoario se comporta como una mutante de delección natural de los genes que codifican las enzimas de biosíntesis de putrescina, sustancia precursora de las demás poliaminas. Después de transformar *T. cruzi* con plásmidos recombinantes que contienen genes exógenos que codifican ornitina o arginina decarboxilasa de otros organismos, estudiamos la expresión de los genes heterólogos en los parásitos transgénicos.

Palabras Clave: biosíntesis de poliaminas; epimastigotes de *T. cruzi*; ornitina decarboxilasa; arginina decarboxilasa; parásitos transgénicos.

Molecular Biology of polyamine metabolism in trypanosomatid parasites. Expression of heterologous ornithine and arginine decarboxylase genes in *T. cruzi*.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, which affects millions of people in Latin America. Many studies on the biochemistry and molecular biology of parasites try to find whether their metabolic pathways are markedly different from those of the mammalian host in order to detect appropriate targets useful for the design of antiparasitic chemotherapies. Polyamine metabolism in *T. cruzi* is a good candidate due to its unique properties.

Polyamines, a group of low molecular weight basic substances, are present in practically all living organisms and play essential roles in the biosynthesis of nucleic acids and proteins as well as in cell proliferation and differentiation. The inhibition of polyamine biosynthesis is a promising strategy in the search for antiproliferative drugs. The endogenous concentrations of polyamines in mammalian cells are regulated by several mechanisms of retroinhibition and interconversion which can compensate the effect of specific inhibitors. In contrast, polyamine metabolism in many parasites such as *T. brucei*, *T. cruzi* and different species of *Leishmania*, is simpler and cannot be regulated. Therefore, these protozoa need the uptake of polyamines from the external medium for their proliferation. On the other hand, bis-glutathionyl spermidine (trypanothione), a cofactor responsible for the endogenous redox balance, has been found exclusively in trypanosomatid protozoa; this fact can explain the selective antiparasitic effect of some drugs blocking polyamine biosynthesis.

Trypanosoma cruzi is the only eukaryotic organism unable to synthesize polyamines "de novo" due to the absence of ornithine and arginine decarboxylases, the enzymes catalysing the first step of both metabolic pathways in polyamine biosynthesis. Studies carried out in our laboratory have shown that the lack of these enzymatic activities is not caused by internal inhibitory factors in the parasite, but to the absence of the corresponding genes in the *T. cruzi* genome. Therefore, this parasite behaves as a natural deletion mutant of genes coding for putrescine biosynthetic enzymes. We have prepared transformed *T. cruzi* by electroporation with recombinant plasmids bearing exogenous ornithine and arginine decarboxylase genes from other organisms, and the expression of the heterologous genes in the transgenic parasites have been investigated.

Key words: polyamine biosynthesis; *T. cruzi* epimastigotes; ornithine decarboxylase; arginine decarboxylase; transgenic parasites.

Introducción

Las poliaminas son un grupo de sustancias básicas de bajo peso molecular que están presentes en prácticamente todas las células procarióticas, eucarióticas y arqueobacterias con muy pocas excepciones. Desempeñan múltiples funciones esenciales tanto en la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas, como en la proliferación y diferenciación celular (1-3). Su flexible esqueleto alifático y su naturaleza policatiónica con cargas positivas distanciadas entre sí (Figura 1) les permite interactuar con diferentes regiones de macromoléculas o estructuras cargadas negativamente como el DNA, RNA, nucleoproteínas, fosfolípidos, partículas ribosomales y membranas, lo que explica su participación en procesos tan diversos como la replicación del DNA, transcripción, síntesis proteica y multiplicación celular. La determinación de los niveles de poliaminas y de la enzima que cataliza el primer paso de su biosíntesis durante el ciclo celular ha indicado que aumentan significativamente en la interfase G1/S y durante G2 antes del comienzo de la mitosis. Estos resultados confirman la importancia de las poliaminas en la proliferación celular (4-6).

Putrescina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Espermidina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Espermina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

Figura 1: Estructura de poliaminas

La síntesis de poliaminas en células eucarióticas se inicia con la decarboxilación de ornitina para producir putrescina en una reacción catalizada por la enzima ornitina decarboxilasa (ODC). La putrescina a su vez puede añadir uno o dos grupos aminopropilos formando espermidina o espermina, respectivamente (Figura 2). En estos casos el dador de grupos aminopropilos es el compuesto S-adenosil metionina decarboxilado que se forma a partir de S-adenosil metionina. La degradación intracelular de poliaminas se inicia por un proceso de reconversión que consiste en dos etapas: acetilación y posterior oxidación, o una reacción directa de oxidación (7,8).

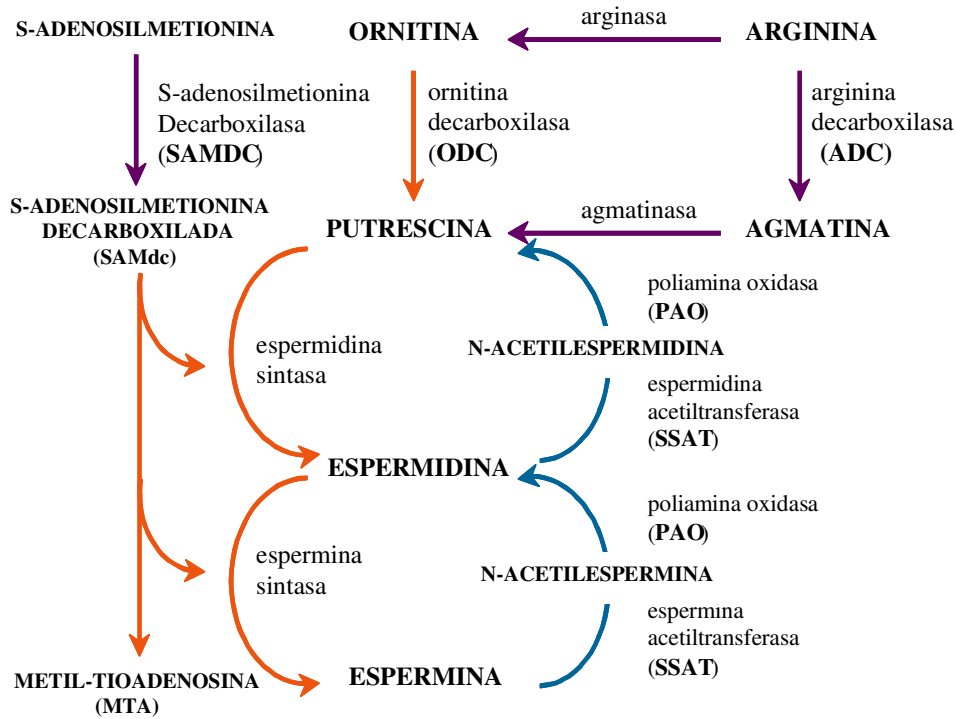


Figura 2: Metabolismo general de las poliaminas.

La concentración endógena de poliaminas en las células de mamíferos se encuentra estrictamente regulada por una serie de mecanismos de homeostasis que comprende tanto su biosíntesis y transporte desde el medio externo como su degradación y excreción. Las enzimas limitantes de la biosíntesis son la ODC y la S-adenosil metionina decarboxilasa (SAMDC). Ambas tienen una reducida estabilidad metabólica con vidas medias del orden de 30 minutos y tanto su inducción como su degradación varían por mecanismos compensatorios que responden a la reducción o aumento de los niveles intracelulares de poliaminas (9). La ODC de células animales, como otras proteínas metabólicamente inestables contienen en su estructura regiones PEST que son segmentos ricos en los aminoácidos prolina, ácido glutámico, serina y treonina. En general en estos casos las secuencias PEST se encuentran ubicadas cerca del extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. La degradación de la enzima está regulada por una proteína específica llamada antizima, que al unirse a los monómeros de ODC impide la formación de los dímeros activos, dejando expuestas las regiones PEST. Los monómeros unidos a antizima son entonces reconocidos por el proteosoma 26S que degrada rápidamente la enzima ODC liberando al mismo tiempo la antizima en un proceso independiente de ubiquitina (10-12). La cantidad de antizima aumenta en las células cuando se incrementan los niveles endógenos de poliaminas, que de esta manera tienden a regularse por destrucción de ODC.

En células de plantas y en bacterias se ha descrito una segunda vía biosintética de poliaminas que comprende dos etapas: la decarboxilación de arginina por arginina decarboxilasa (ADC) para dar agmatina, y la posterior hidrólisis de esta sustancia dando lugar a la formación de putrescina mediante una reacción catalizada por la enzima agmatinasa (Figura 2).

La síntesis de difluormetilornitina (DFMO) permitió disponer del primer inhibidor específico e irreversible de ODC (13-15). Esta droga análoga a ornitina causa la supresión del contenido intracelular de poliaminas, y como consecuencia la detención de la proliferación celular en cultivos "in vitro". Estos resultados llevaron a probar DFMO como posible agente antitumoral, pero los ensayos en modelos "in vivo" indicaron que en estas condiciones el inhibidor sólo ejerce efectos citostáticos y no citotóxicos, debido a mecanismos celulares compensatorios como el aumento del transporte de poliaminas o la inducción de las enzimas responsables de su biosíntesis (16,17).

Metabolismo de poliaminas en parásitos.

Los tripanosomátidos constituyen un grupo de protozoarios parásitos que utilizan uno o dos organismos hospedadores para completar su ciclo de vida. Entre los tripanosomátidos monogenéticos cuyos únicos huéspedes son insectos se han caracterizado diversas especies de los géneros *Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas*. Los tripanosomátidos digenéticos utilizan como hospedadores a insectos y a vertebrados (o plantas) y tienen ciclos de vida complejos durante los cuales sufren procesos de diferenciación que involucran grandes cambios fisiológicos y bioquímicos que les permiten adaptarse a los ambientes que encuentran en sus hospedadores (18,19). El grupo de protozoarios tripanosomátidos digenéticos incluye parásitos patógenos para el hombre que causan graves enfermedades como el Mal de Chagas producido por *Trypanosoma cruzi*, la Enfermedad del Sueño causada por *Trypanosoma brucei* y varios tipos de leishmaniasis originadas por la infección con diferentes especies del género *Leishmania*.

Los organismos parásitos se caracterizan porque muchas veces no poseen caminos metabólicos que están presentes en sus hospedadores mamíferos de los cuales pueden obtener metabolitos que necesitan para su supervivencia y proliferación sin necesidad de sintetizarlos *de novo*. Se ha demostrado que durante la evolución el genoma de algunos parásitos ha perdido conjuntos de genes que codifican las enzimas responsables de las vías metabólicas cuyos productos sintetizados por los hospedadores son internalizados y utilizados directamente por los parásitos. Este es el caso de la putrescina en *T. cruzi*, que la transporta a su interior y la usa como precursor de espermidina y tripanotona.

Numerosos estudios sobre la bioquímica y biología molecular de los tripanosomátidos digenéticos intentan buscar diferencias en el metabolismo entre los parásitos y las células de sus hospedadores mamíferos, con el propósito de detectar blancos adecuados para el diseño de estrategias quimioterapéuticas efectivas contra las enfermedades parasitarias. El metabolismo de poliaminas de los parásitos presenta propiedades significativamente diferentes al de las células humanas. Por lo tanto se puede esperar que algunas drogas antipoliamínicas puedan eliminar selectivamente los parásitos sin mayores efectos sobre los hospedadores.

Trabajos realizados en diferentes laboratorios sobre protozoarios tripanosomátidos han demostrado que la biosíntesis de poliaminas en *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata* y distintas especies de *Leishmania* ocurre mediante la acción inicial de la enzima ornitina decarboxilasa (18-20), y que el transporte de putrescina y espermidina desde el medio externo es relativamente reducido pero puede inducirse significativamente al disminuir los niveles endógenos de poliaminas. Es interesante señalar que algunas propiedades de la enzima ODC en tripanosomátidos digenéticos son muy diferentes a la de la misma enzima en células animales y parásitos monogenéticos. La ODC de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* es metabólicamente estable, con una vida media mayor a 8 horas

en contraposición a lo que sucede en células de mamíferos y en *Crithidia fasciculata* donde es inestable (vida media de 30 minutos). Coffino y su grupo (21-24) demostraron que aunque la ODC de *T. brucei* y de células de ratón tienen una estructura relativamente homóloga, a la primera le falta el segmento del extremo C-terminal del polipéptido de aproximadamente 35 aminoácidos, presente en la enzima de células de mamíferos, que contiene la región PEST responsable de la rápida degradación de la proteína. Esta conclusión fue confirmada al preparar moléculas recombinantes con la estructura de ODC de *T. brucei* fusionada a la región del extremo C-terminal de la enzima de ratón, que resultó inestable. En el caso de la ODC de *Crithidia fasciculata* se determinó que aunque tiene una alta identidad de secuencia (69 %) con la enzima de *Leishmania donovani*, y tampoco contiene la región PEST del extremo C-terminal, sin embargo es inestable, indicando que las señales de degradación pueden estar en regiones aún no determinadas de su estructura (24). La diferencia de estabilidad de la ODC de parásitos digenéticos y de células animales parece ser la razón del efecto antiparasitario selectivo de la droga DFMO, inhibidor específico de ODC. El rápido recambio de la enzima en células de mamíferos determina la continua síntesis de nueva enzima que permite eludir el efecto del DFMO; en cambio la ODC estable del *T. brucei* permanece permanentemente inhibida por la droga, produciendo la drástica reducción de los niveles endógenos de poliaminas y el consecuente bloqueo de la proliferación del parásito (25). Estas consideraciones están de acuerdo con resultados de Bacchi y colaboradores que encontraron que la inhibición de la actividad de ODC por DFMO puede curar infecciones agudas de conejos con *Trypanosoma brucei brucei* (26,27). La misma droga ha sido efectiva en el tratamiento de la enfermedad del sueño en humanos provocada por *el Trypanosoma brucei gambiense* (28).

El compuesto bis-glutationil espermidina (tripanotona) se ha encontrado exclusivamente en parásitos tripanosomátidos (29). Esta sustancia mantiene el balance endógeno de oxido-reducción de los parásitos y es su principal defensa contra superóxidos y radicales libres (30), por lo que el bloqueo de su síntesis puede ser un punto clave de terapias antiparasitarias específicas (Figura 3).

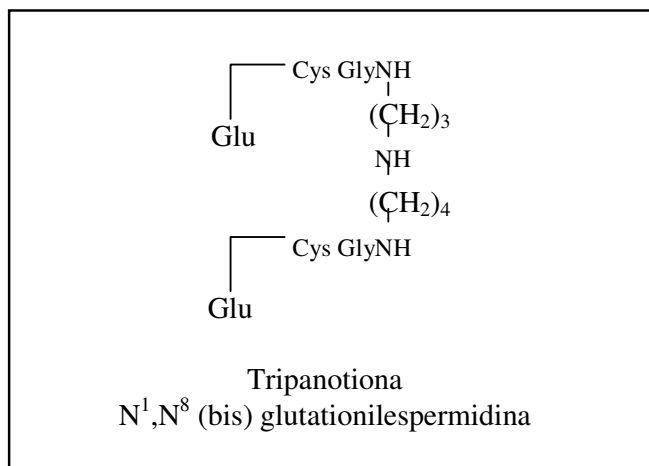


Figura 3: Estructura de la tripanotona.

Como ya se ha mencionado la síntesis, interconversión y transporte de poliaminas en células de mamíferos puede ser regulada por múltiples mecanismos de inducción, represión, activación y retroinhibición (7,8). En contraposición, en muchos parásitos los caminos biosintéticos que producen poliaminas son más simples y en general poco sensibles a mecanismos de regulación (18).

Metabolismo de poliaminas en *T. cruzi*.

El *Trypanosoma cruzi* es un caso único ya que la actividad enzimática de ODC es no detectable y los niveles endógenos de poliaminas dependen de un activo sistema constitutivo de transporte (31,32).

Estudios realizados en nuestro laboratorio usando formas epimastigotes de *T. cruzi* han demostrado que este parásito es el único organismo eucariótico conocido que carece de la capacidad de sintetizar poliaminas *de novo* (31,33). Esta deficiencia se debe a la falta de las actividades enzimáticas de ornitina y arginina decarboxilasas que en todas las condiciones de ensayo dieron valores despreciables en diferentes cepas del protozoario. Estos resultados concuerdan con experimentos “in vivo” en los que demostramos que *T. cruzi* no puede mantener su crecimiento en un medio de cultivo semisintético que no contiene poliaminas. El agregado de ornitina o arginina al medio no reinicia la proliferación, confirmando que estos dos aminoácidos no pueden ser precursores de poliaminas en epimastigotes de *T. cruzi*. Sólo el agregado de putrescina o espermidina permite reiniciar la multiplicación del parásito (34) (Figura 4).

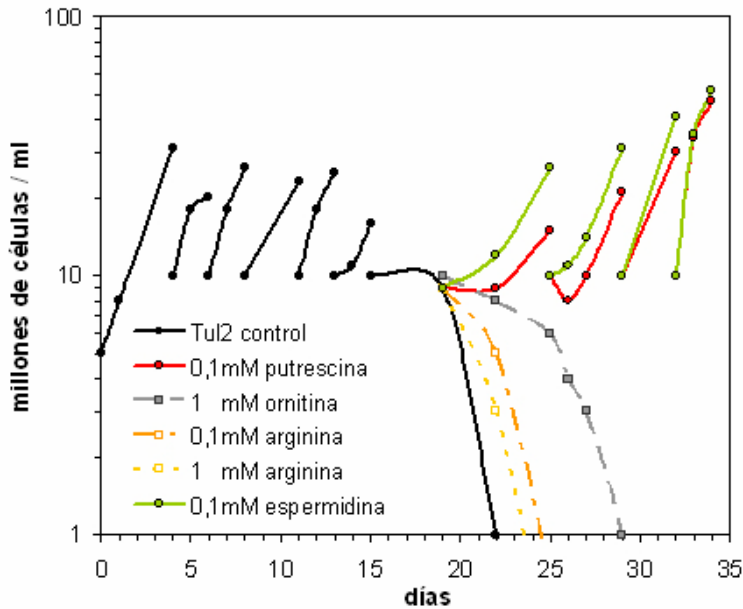


Figura 4: Crecimiento de *T. cruzi* en medio semisintético SDM₇₉ con distintos suplementos.

Existe una correlación entre el crecimiento de *T. cruzi* en diversas condiciones y los correspondientes niveles intracelulares de poliaminas. Se pudo determinar que la proliferación del parásito depende exclusivamente de las concentraciones endógenas de espermidina, ya que el agregado al cultivo de putrescina junto con ciclohexilamina, que inhibe su conversión a espermidina, no permite la multiplicación de *T. cruzi* aunque el nivel de putrescina se encuentre marcadamente aumentado. La espermidina debe ser indispensable, porque además de cumplir las múltiples funciones de las poliaminas, es el sustrato obligado para sintetizar tripanotona (35) (Figura 5).

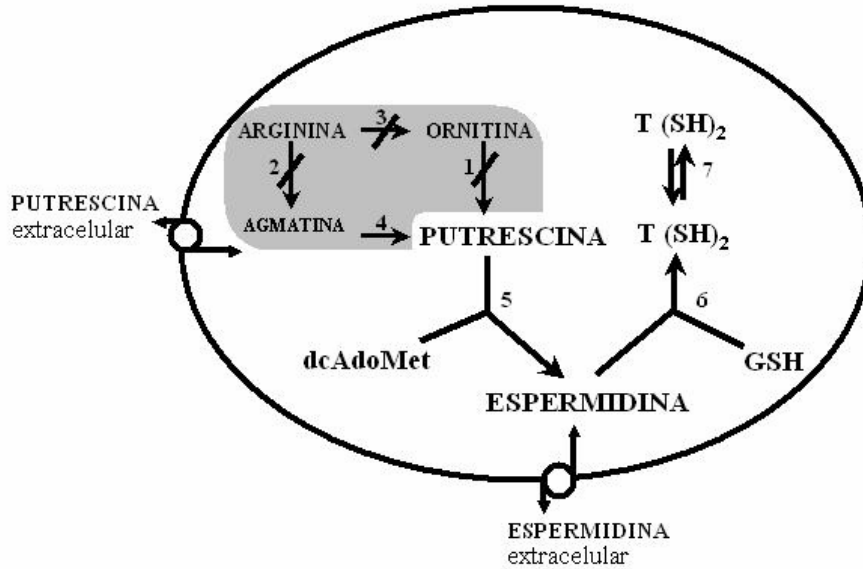


Figura 5: Metabolismo de poliaminas en *T. cruzi*.

1: ornitina decarboxilasa; 2: arginina decarboxilasa; 3: arginasa; 4: agmatinasa; 5: espermidina sintetasa; 6: tripanotona sintetasa; 7: tripanotona reductasa.

Ornitina decarboxilasa, arginina decarboxilasa, arginasa y agmatinasa están ausentes en *T. cruzi*.

La ausencia de las actividades enzimáticas de ODC y ADC en *T. cruzi* pueden deberse a varias causas (Tabla 1).

Tabla 1: Causas de falta de actividad enzimática de ADC en *T. cruzi*

- Transporte deficiente de arginina
- Presencia de inhibidores de ADC en *T. cruzi*
- Represión del gen de ADC
- Ausencia del gen de ADC en el genoma de *T. cruzi*

Hemos investigado todas estas posibilidades y encontramos que los aminoácidos ornitina y arginina se transportan eficientemente y son normalmente utilizados por los parásitos. Además no se han podido detectar inhibidores de las enzimas ODC o ADC en los extractos de epimastigotes de *T. cruzi*. También se ha descartado que el medio interno del parásito pudiera contener represores de la expresión de los genes de ODC y ADC. Esta conclusión se basa en experimentos de transformación de cepas salvajes de *T. cruzi* con plásmidos recombinantes que contenían las regiones codificantes de genes heterólogos de ODC o ADC. En ambos casos se obtuvo parásitos transformados con altos niveles de expresión de los genes exógenos (31, 33, 36).

Los análisis de bioinformática basados en los datos disponibles de la secuenciación del genoma de *T. cruzi* y los ensayos de hibridación del DNA total del parásito con sondas específicas homólogas a regiones conservadas en genes de ODC o ADC de muchos organismos indicaron que el genoma de cepas salvajes de *T. cruzi* no contiene secuencias de nucleótidos relacionadas a las presentes en los genes de ODC y ADC (33,36).

Transformación de *Trypanosoma cruzi* con genes exógenos de ODC y ADC

Dado que el *Trypanosoma cruzi* se comporta como una mutante de delección natural de los genes de ODC y ADC, hemos transformado parásitos salvajes con plásmidos recombinantes que contienen la región codificante completa del gen de ODC de *Crithidia fasciculata* o de ADC de avena. Para ambas construcciones se usó el vector de expresión pRIBOTEX, específico para transformaciones de *T. cruzi*, y las regiones polinucleotídicas correspondientes a los genes de ODC o ADC obtenidas por amplificación PCR con los templados de DNA y los "primers" adecuados (Figura 6).

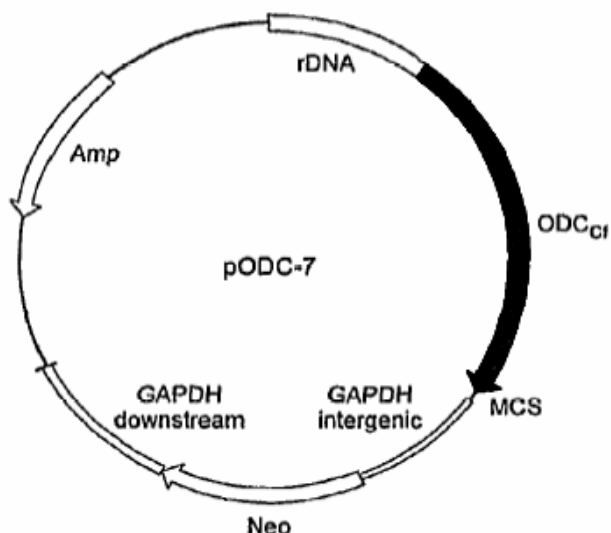
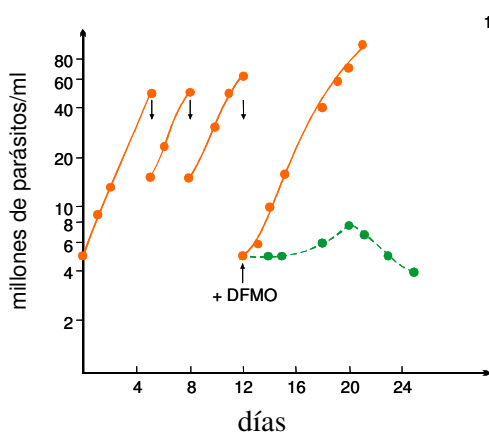


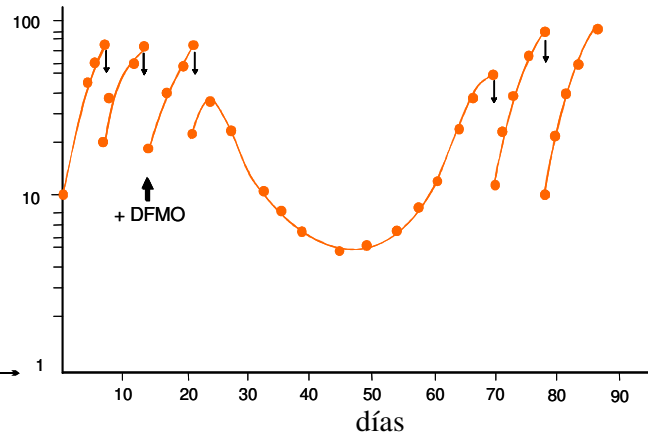
Figura 6 Plásmido p-ODC7

Los parásitos transfectados con el gen exógeno de ODC mostraron altos niveles de actividad enzimática. Al mismo tiempo se volvieron autótrofos para putrescina ya que podían proliferar continuamente en medios de cultivo sintéticos sin necesidad del agregado de poliaminas. Asimismo se pudo observar que los *T. cruzi* transformados que expresaban ODC se volvían sensibles a la droga DFMO que entonces podía bloquear la proliferación de estos parásitos cultivados en medios sintéticos (Figura 7). Pero después de un período de inhibición del crecimiento de varias semanas y en presencia continua de DFMO a altas concentraciones se producía la reiniciación espontánea del crecimiento de los *T. cruzi* transformados que se habían vuelto resistentes a la droga (Figura 8).



Crecimiento en medio sintético

Figura 7



Respuesta a la presencia de DFMO

Figura 8

Se pudo determinar que la resistencia al DFMO no se debía a la aparición de impermeabilidad a la droga ni a ninguna mutación de la enzima blanco (ODC) que pudiera disminuir su afinidad por el inhibidor, sino a la amplificación del gen de ODC en los parásitos resistentes. Esta conclusión está apoyada por análisis de hibridación Southern con sondas específicas para ODC en DNA de parásitos sensibles (Tul 7) y resistentes (Tul 7R) a DFMO (Figura 9A). Estos últimos también contienen una actividad aumentada de la enzima ODC (Figura 9B).

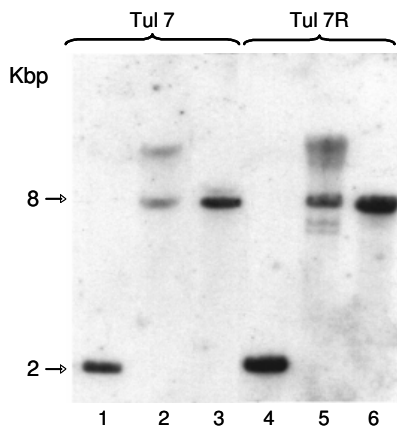


Figura 9A

Hibridación con sonda específica

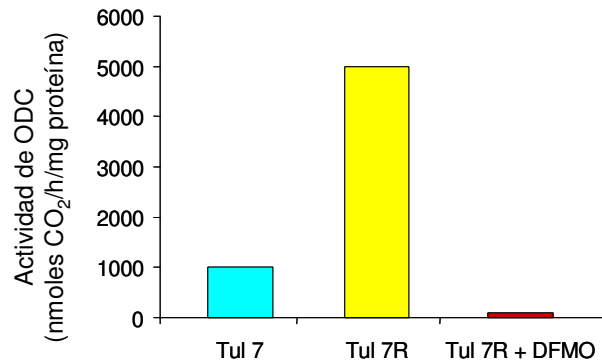


Figura 9B

Actividad enzimática

Al transfectar *T. cruzi* con un plásmido recombinante que contiene el gen de ADC de avena, se observó actividad enzimática a los pocos días de la transformación y los valores fueron decreciendo en las semanas siguientes. Pero la presencia continuada de geneticina (antibiótico usado para seleccionar parásitos transformados) en los cultivos, provocó la reaparición de la actividad ADC que aumentó posteriormente hasta niveles elevados cuando se alcanzó la transformación estable (Figura 10).

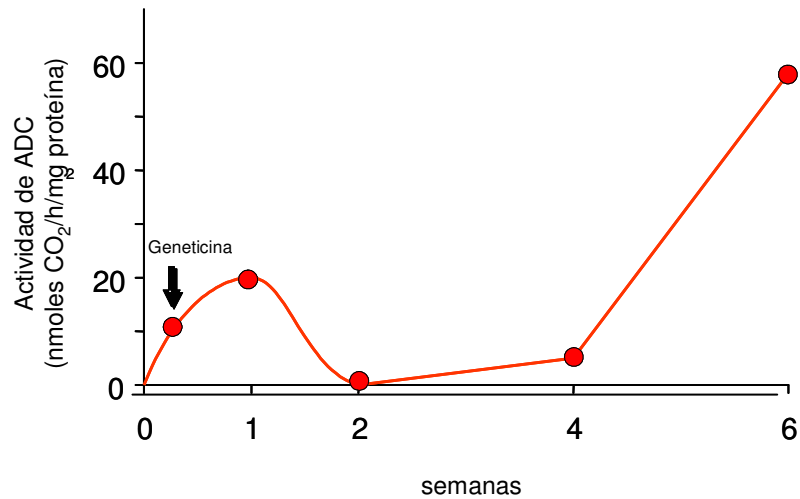


Figura 10 Actividad de ADC después de electroporación.

Organización genómica de los parásitos transgénicos.

Con el propósito de determinar si el plásmido transformante se integra al genoma del parásito o queda libre como un episoma, realizamos ensayos de PCR con DNA obtenido de *T. cruzi* transgénicos cosechados a distintos tiempos después de la transformación y dos pares de "primers": 1) T7 que es específico para la región promotora del vector pRIBOTEX junto al "primer" RIB que corresponde al locus ribosomal del genoma del parásito y 2) el mismo T7 y el "primer" 7C, que es específico para la región codificante del gen de ODC. Se puede predecir que si el plásmido recombinante queda libre, el producto de PCR con los "primers" T7 y 7C debiera ser un segmento amplificado de DNA de alrededor de 2500 pares de bases, sin ningún producto con el otro par de "primers". En cambio después de una integración total de una copia del plásmido en el genoma del parásito, el único producto de amplificación de los dos ensayos de PCR sería un segmento de 890 pares de bases obtenido con el par de "primers" T7 y RIB. Si dos o más copias del plásmido se integraran en "tandem" al genoma se obtendrían los dos productos mencionados en los experimentos de PCR (Figura 11A y 12 A). Los ensayos descritos sólo produjeron el segmento de 890 pares de bases con el DNA de parásitos obtenidos después de la transformación estable (Figura 11B). Estos resultados indican la integración de una copia del plásmido en el genoma.

Figura 11 A

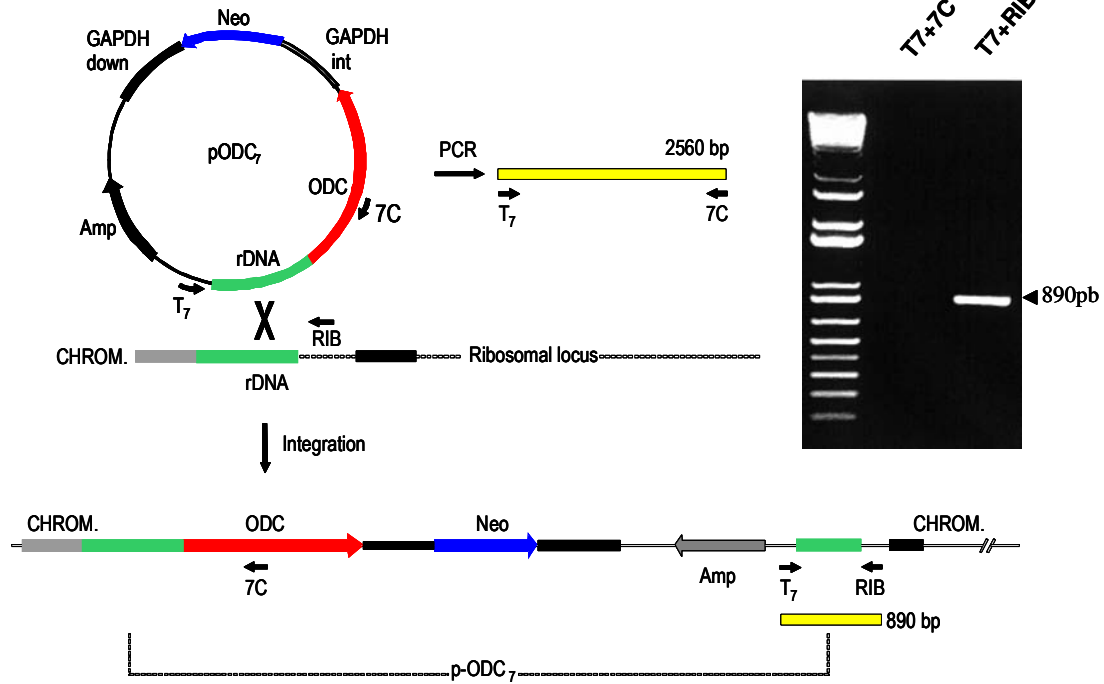


Figura 11B

A Esquemas posibles de organización génica. **B** Productos de PCR obtenidos

El estudio por PCR de la organización genómica de los parásitos transfectados con el gen exógeno de ADC mostró una estricta correlación con la expresión del gen indicada en la Figura 10. Los resultados señalaron que durante los primeros días después de la transfección el plásmido recombinante queda como episoma libre, porque el único producto originado en uno de los ensayos de amplificación con dos pares de "primers" similares a los descritos anteriormente fue un segmento de 2030 pares de bases, generado cuando se usó el par de "primers" T7 y ADC2 (correspondiente a una secuencia interna del gen de ADC) (Figura 12B calles 1 y 2). En el período siguiente de 2 a 3 semanas después de la transformación posiblemente ocurre la degradación del plásmido recombinante hasta niveles casi no detectables (calles 3 y 4 de Figura 12B). Luego, durante la presión selectiva del antibiótico, se induce la integración de dos o más copias del plásmido transformante hasta alcanzar una estructura estable entre 6 a 8 semanas después de la transfección, como lo demuestra la producción de los dos segmentos de amplificación en los experimentos de PCR con los distintos pares de "primers" (calles 7 y 8 de Figura 12B) (36).

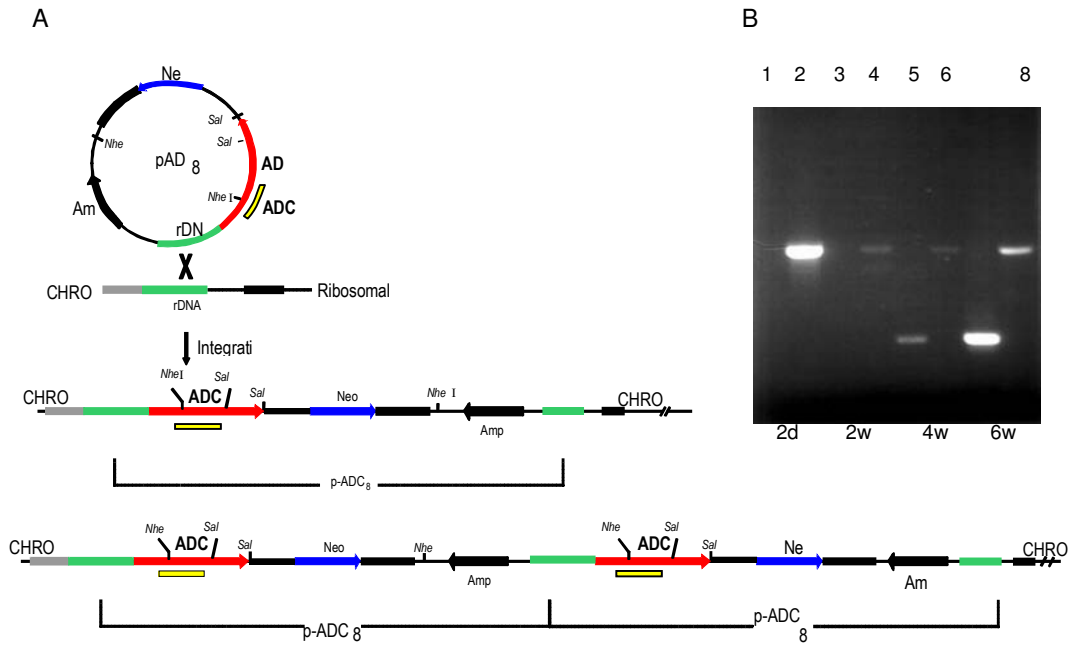


Figura 12A Esquemas posibles de organización génica. **B** Productos de PCR.

El gen heterólogo de ADC introducido en el plásmido recombinante se encuentra bajo el control del promotor ribosomal. Por esta razón la enzima responsable de la transcripción del gen resultó ser la RNA polimerasa I (que también sintetiza el RNA ribosomal) y no RNA polimerasa II que transcribe la mayoría de los genes que codifican proteínas. Estas conclusiones se basan en la sensibilidad a alfa-amanitina de la transcripción del gen de ADC (Figura 13).

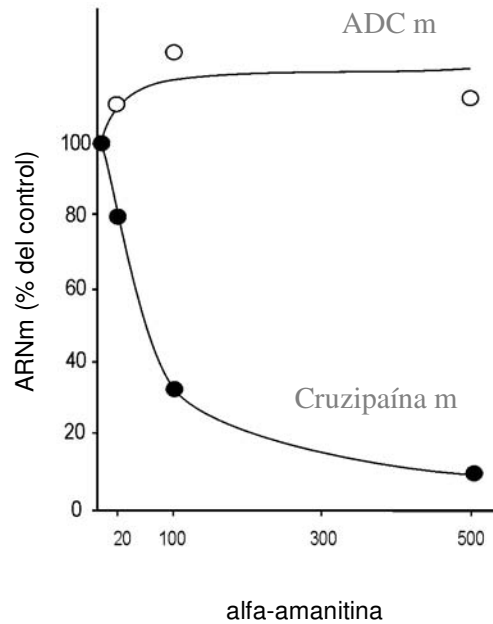


Figura 13: Sensibilidad a alfa-amanitina de la transcripción de ADC y cruzipaina

Conclusiones

a) El protozooario *Trypanosoma cruzi* no contiene las actividades enzimáticas de ODC y ADC, por lo que es incapaz de sintetizar poliaminas “de novo”.

b) La falta de las actividades enzimáticas se debe a la ausencia de los genes correspondientes en su genoma.

c) Los parásitos transformados con plásmidos recombinantes adecuados pueden expresar genes heterólogos de ODC y ADC, demostrando que el medio intracelular de *T. cruzi* no inhibe la expresión de los genes mencionados.

d) La presencia de DFMO por períodos prolongados en los cultivos de parásitos transformados con el gen de ODC induce la amplificación del gen exógeno y la aparición de *T. cruzi* resistentes a la droga.

e) Ambos genes heterólogos se integran al genoma del parásito aunque posiblemente con diferentes mecanismos: 1) los *T. cruzi* transformados con ODC muestran una integración temprana de una copia del plásmido; 2) en cambio, en los parásitos transfectados con ADC, el plásmido recombinante permanece como episoma por varias semanas. Durante este período la actividad de la enzima es transitoria y posteriormente, a las 4 o 6 semanas, la expresión se vuelve estable con la concomitante integración de dos o más copias en “tandem” del plásmido transformante en el genoma de *T. cruzi*.

Agradecimientos

Los experimentos descriptos realizados en nuestro laboratorio fueron financiados en parte por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la Universidad de Buenos Aires, la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica y el International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB, Trieste, Italia).

Bibliografía

1. Cohen S, 1998. A guide to the polyamines. Oxford University Press, Oxford.
2. Pegg AE, 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* 48: 759-774.
3. Wallace HM, 1998. Polyamines: specific metabolic regulators or multifunctional polycations? *Biochem. Soc. Trans.* 26: 569-571.
4. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A, 2003. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* 376: 1-14.
5. Igarashi K, Kashiwagi K, 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 559-564.
6. Tabor CW, Tabor H, 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749-790.
7. Pegg AE, 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234: 249-262.
8. Bolkenius FN, Seiler N, 1981. Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism. *Int. J. Biochem.* 13: 287-292
9. Heby O, Persson L, 1990. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 15: 153-158.
10. Hayashi S, Murakami Y, 1995. Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.* 306: 1-10.
11. Hayashi S, Murakami Y, Matsufuji S, 1996. Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends. Biochem. Sci.* 21: 27-30.
12. Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi S, Tanahashi N, Tabaka K, 2000. Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 1-6.
13. Metcalf BW, Bey P, Danzin C, Jung MJ, Casara P, Vevert JP, 1978. Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase by substrate and product analogs. *J. Am. Chem. Soc.* 100: 2551-2553.
14. Marton LJ, Pegg AE, 1995. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 55-91.
15. Wang CC, 1995. Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 93-127.
16. Pegg AE, McCann PP, 1982. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 243: C212-C221.
17. Saydjari R, Alexander RW, Upp Jr JR, Barranco SC, Townsed Jr. CM, Thompson JC, 1991. Differential sensitivity of various human tumors to inhibition of polyamine biosynthesis in vivo. *Int. J. Cancer.* 47: 44-48.

18. Fairlamb AH, 1981. Alternate metabolic pathways in protozoan energy metabolism. *Parasitology*. 82: 1-30.
19. Pegg AE, McCann PP, 1988. Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans. *ISI Atlas of Science: Biochemistry* 11-18.
20. Sánchez CP, González NS, Algranati ID, 1989. Stable ornithine decarboxylase in promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Biochem. Biophys. Res. Común.* 161: 754-761.
21. Phillips MA, Coffino P, Wang CC, 1987. Cloning and sequencing of the ornithine decarboxylase gene from *T. brucei*. *J. Biol. Chem.* 262: 8721-8727.
22. Goda L, Phillips MA, Bass KE, Wang CC, Coffino P, 1990. Trypanosome ornithine decarboxylase is stable because it lacks sequences found in the carboxyl terminus of the mouse enzyme which target the latter for intracellular degradation. *J. Biol. Chem.* 265: 11823-11826.
23. Goda L, Sidney D, Macrae M, Coffino P, 1992. Structural elements of ornithine decarboxylase required for intracellular degradation and polyamine-dependent regulation. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2178-2185.
24. Svanson F, Ceriani C, Lövkvist Wallström E, Kockum I, Algranati ID, Heby O, Persson L, 1997. Cloning of a trypanosomatid gene cloning for an ornithine decarboxylase that is metabolically unstable even though it lacks the C-terminal degradation domain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94: 397-402.
25. Carrillo C, Cejas S, Cortés M, Ceriani C, Huber A, González NS, Algranati ID, 2000. Sensitivity of trypanosomatid protozoa to DFMO and metabolic turnover of ornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 663-668.
26. Bacchi CJ, Nathan HC, Hutner SH, McCann PP, Sjoerdsma A, 1980. Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes, *Science* 210: 332-334.
27. Bacchi CJ, McCann PP, 1987. Inhibition of polyamine metabolism. Biological significance and bases for new therapies. *Academic Press, Inc*, pp 317-344.
28. Van Nieuwenhove S, Schechter PJ, Declercq J, Boné G, Burke J, Sjoerdsma A. 1985. Treatment of gambiense sleeping sickness in the Sudan with oral DFMO, an inhibitor of ornithine decarboxylase: first field trial. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 692-698.
29. Fairlamb AH, Cerami A, 1985. Identification of a novel thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14: 187-198.
30. Shames SL, Fairlamb AH, Cerami A, Walsh CT, 1986. Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry* 25: 3519-3526.
31. Carrillo C, Cejas S, González NS, Algranati ID, 1999. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS Lett.* 454: 192-196.
32. Algranati ID, Sánchez CP, González NS, 1990. Polyamines in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *The biology and chemistry of polyamines*. IRL Press, pp 137-146.

33. Carrillo C, Serra MP, Pereira CA, Huber A, González NS, Algranati ID, 2004. Heterologous expression of a plant arginine decarboxylase gene in *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1674: 223-230.
34. Carrillo C, Cejas S, Huber A, González NS, Algranati ID, 2003. Lack of arginine decarboxylase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50: 312-316.
35. González NS, Huber A, Algranati ID, 2001. Spermidine is essential for normal proliferation of trypanosomatid protozoa. *FEBS Lett.* 508: 323-326.
36. Serra MP, Carrillo C, González NS, Algranati ID, 2006. Modulation of oat arginine decarboxylase gene expression and genome organization in transgenic *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *FEBS Journal* 273: 628-637.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**
Número 2, año 5, agosto 2006
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar