

Microtransplantes proteicos:

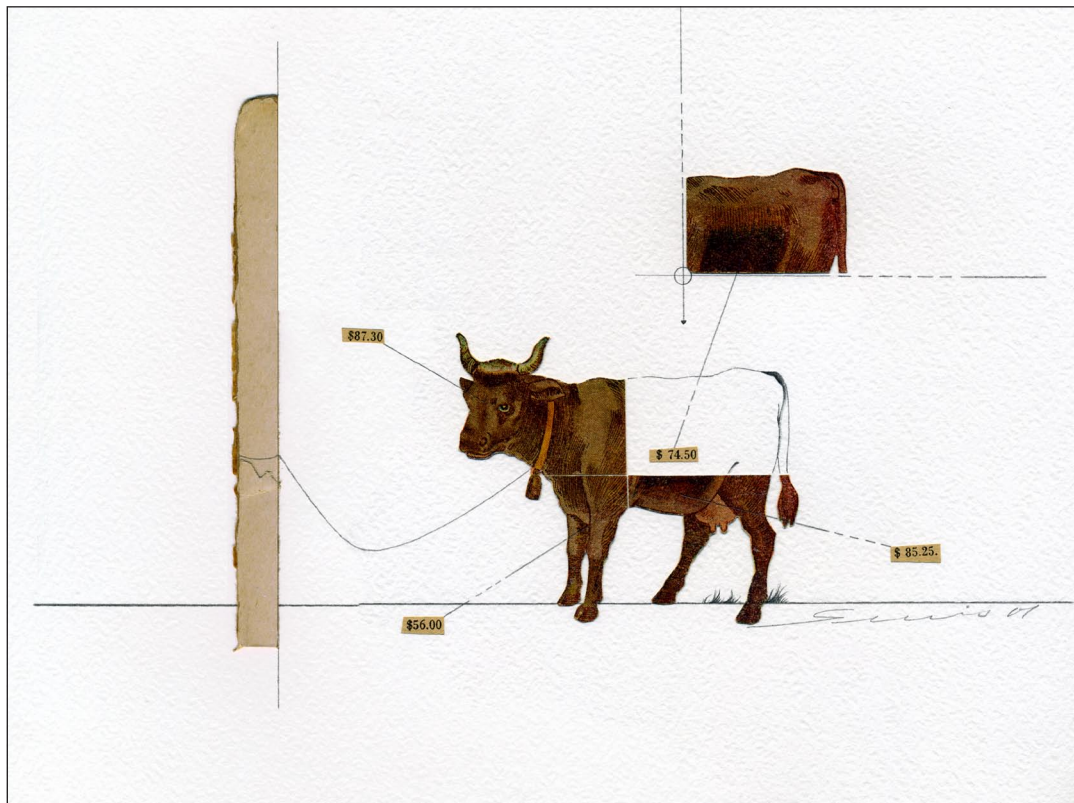
un ACERCAMIENTO a los desórdenes neurológicos

Angélica **Almanza**

Francisco S. **Mercado**

Comprender el cerebro, su estructura y función es una de las mayores ambiciones de la humanidad. Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de las funciones cerebrales, las neurociencias son una de las áreas de la ciencia con mayor número de preguntas sin resolver.

El cerebro, al igual que el resto de los órganos que constituyen un ser vivo, está compuesto por células. La unidad funcional del tejido nervioso es la neurona y conformándolo encontramos miles de millones de ellas, las cuales están interconectadas unas con otras formando la red de comunicación más compleja encontrada hasta ahora en la naturaleza. Esta red es el sustento de las funciones psíquicas superiores como la memoria, el pensamiento creativo, el aprendizaje, la percepción, etcétera. La conexión entre neuronas individuales es la unidad funcional básica del sistema nervioso y es conocida como sinapsis. Una sola neurona puede estar conectada con miles de neuronas a la vez, lo que da a la red una gran complejidad.



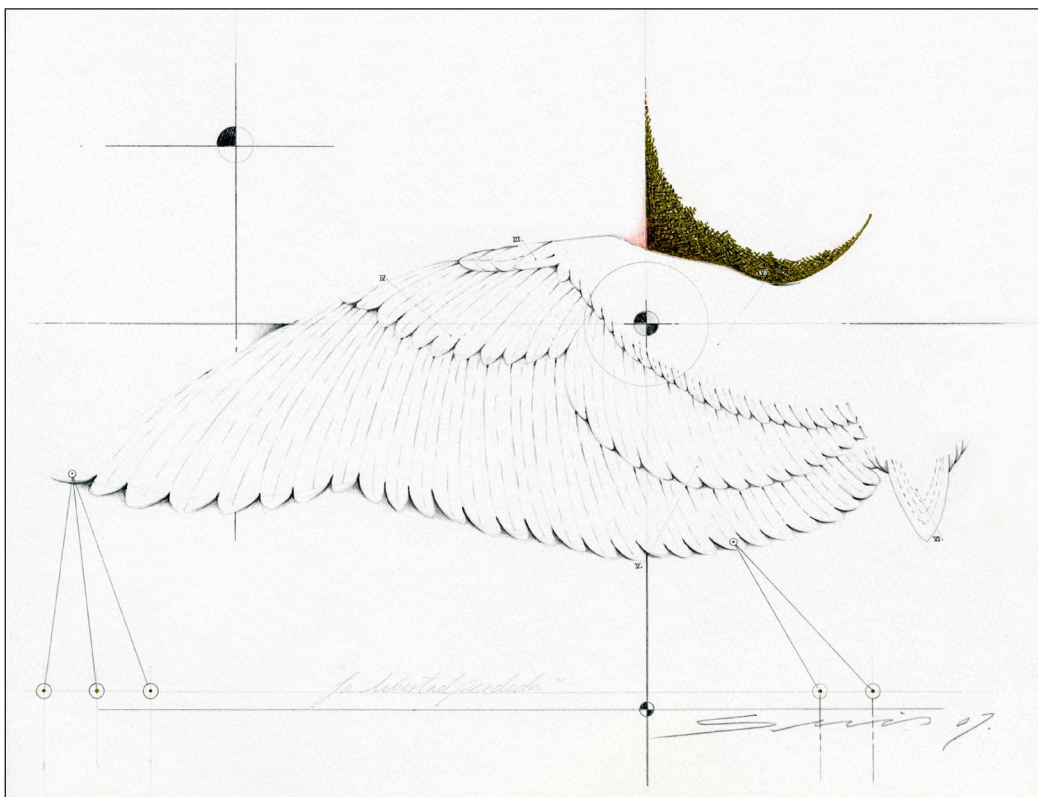
© Luz María Genis.

Cuando una neurona hace contacto sináptico con otra neurona, éstas se comunican a través de mensajeros químicos llamados neurotransmisores, los cuales son pequeñas moléculas que se liberan desde una neurona hacia el espacio existente entre las dos neuronas (conocido también como espacio sináptico) uniéndose a sus sitios receptores presentes en la membrana celular, los cuales son proteínas de superficie que cuando el transmisor se les une desencadenan la señal en la neurona receptora (ya sea la clásica señal eléctrica u otra señal química en el interior de la neurona) produciendo su activación (excitación) o su silenciamiento (inhibición).

Las neuronas tienen prolongaciones que pueden ser inusualmente largas (en un ser humano pueden medir un metro o más de longitud) y la señal excitatoria generada a partir de la activación de sus receptores de membrana se propaga a lo largo de ella en forma de potenciales de acción. Se le llama potencial de acción al cambio súbito en el voltaje de la membrana neuronal; normalmente este cambio es de corta duración y se propaga a lo largo de todo el axón. El potencial de acción es generado por

el movimiento de los iones que se encuentran tanto en el líquido intracelular como en el extracelular a través de la membrana. Los iones, que normalmente no pueden atravesar la membrana celular, fluyen a través de poros proteicos llamados canales iónicos. Una vez que el potencial de acción llega al sitio donde la neurona hace contacto con otra (por su forma también llamado botón sináptico), el cambio en el voltaje produce una serie de eventos en el interior del botón que al final producen la liberación del neurotransmisor, con lo cual la señal se propaga a la siguiente neurona. Este fenómeno de transmisión sináptica se repite ininidad de veces al día, ya que ocurre para cualquier actividad que realizamos por muy simple que esta parezca, incluso cuando aparentemente no tenemos actividad como, por ejemplo, durante el dormir.

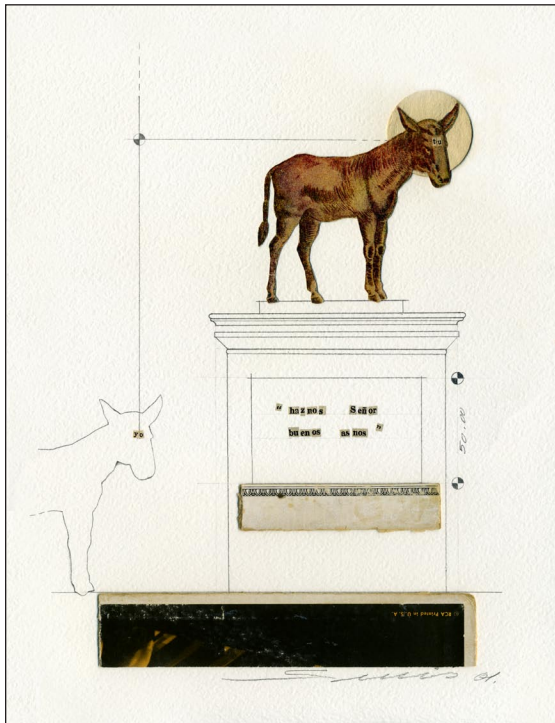
Debido a la complejidad de las interconexiones en el cerebro, es de suponer que cualquier anomalía en un receptor de membrana, canal iónico, o en el establecimiento de conexiones sinápticas de algún circuito neuronal (conexiones específicas entre neuronas de distintas partes del cerebro) puede ser la causa de una función inadecuada del sistema nervioso, lo que a su vez puede traducirse en una patología neuropsiquiátrica.



© Luz María Genis.

Las propiedades funcionales de diversos receptores a neurotransmisores, canales iónicos y otras proteínas de membrana han sido estudiadas usando diversas estrategias tales como el registro electrofisiológico y la medición de flujo iónico en vesículas formadas a partir de membranas celulares en las cuales se encuentran dichas proteínas. Sin embargo, el estudio de las proteínas de membrana expresadas en células del sistema nervioso no es una tarea fácil, debido entre otras causas al diminuto tamaño de la mayoría de las células nerviosas. Una técnica desarrollada para estudiar tanto la estructura como la función de estas proteínas consiste en expresar proteínas provenientes de células del sistema nervioso en *ovocitos* (huevos gigantes) de la rana sudafricana *Xenopus laevis*, los cuales prácticamente no contienen receptores de membrana. En este sistema, la inyección citoplasmática o nuclear de ácidos nucleicos (RNA mensajero o DNA complementario respectivamente, que constituyen la cinta magnética que da las instrucciones para la síntesis proteica y en general para el funcionamiento de la célula) conlleva a la síntesis e incorporación de la proteína funcional a la membrana del ovocito, es decir, la maquinaria para la síntesis proteica del

ovocito puede leer una receta para sintetizar proteínas aun cuando ellas correspondan a células de otras especies. Debido al gran tamaño del ovocito, tanto la inyección de ácidos nucleicos como el registro de la actividad de las proteínas expresadas en él, son procesos fáciles cuando se comparan con otras técnicas y con otras preparaciones celulares. Esta metodología se desarrolló hace más de dos décadas. Inicialmente se encontró que la inyección en ovocitos de *Xenopus* del RNA mensajero aislado del órgano eléctrico del pez *Torpedo* (peces que poseen órganos capaces de producir fuertes descargas eléctricas que el animal utiliza para capturar sus presas y defenderse) generaba la expresión heteróloga (debido a la procedencia del ácido nucleico de una especie distinta a la especie de referencia) de receptores funcionales para la acetilcolina (neurotransmisor de la unión neuromuscular) en la membrana citoplasmática del ovocito.¹ Desde entonces, este modelo experimental ha constituido una herramienta muy útil para el estudio tanto de la estructura como de la función de receptores y canales iónicos. Sin embargo, las proteínas sintetizadas a



© Luz María Genis.

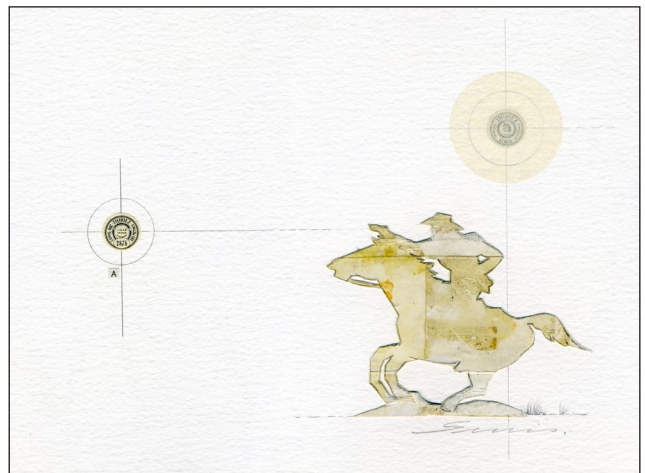
partir de la inyección de ácidos nucleicos heterólogos son insertadas dentro de una membrana que contiene proteínas propias del ovocito, acopladas a diversas vías de señalización intracelular del mismo, lo cual plantea un problema, ya que diversos modelos y estudios muestran que más que ser elementos pasivos, los componentes de membrana como son lípidos y proteínas asociadas, pueden tener un rol esencial y determinante de la función y la regulación de los receptores y canales iónicos.² Adicionalmente, la conformación adecuada de la proteína heteróloga (normalmente proveniente de mamífero) puede no llevarse a cabo adecuadamente en una célula de anfibio (en este caso de la rana *Xenopus*). Por todo ello, el grupo del doctor Ricardo Miledi (científico mexicano y uno de los diez neurobiólogos más citados en la literatura especializada de todos los tiempos) desarrolló una mejora sustancial a la técnica: saltó la maquinaria sintética, la membrana y las proteínas asociadas del ovocito al lograr que los ovocitos incorporaran en su membrana proteínas ensambladas desde la célula nativa y embebidas en su propia membrana celular; a este proceso

se le ha denominado microtransplante proteico. Con la inyección directa de fragmentos de membrana obtenidas de muestras de un tejido en específico, la membrana de los ovocitos adquiere eficientemente canales iónicos y receptores dentro de su propia membrana celular, manteniendo de esta manera sus características estructurales, estequiométricas y, además, el conjunto de posibles proteínas y lípidos asociados a ellos. De esta manera, el grupo del doctor Miledi, ha logrado expresar en la membrana de ovocitos canales iónicos y diversos receptores para neurotransmisores como el glutamato (neurotransmisor excitador por excelencia), acetilcolina (neurotransmisor de la unión neuromuscular) y GABA (neurotransmisor inhibidor) embebidos en membranas provenientes de diversos tejidos tales como el órgano eléctrico del pez torpedo,³ estructuras de cerebro humano de pacientes sanos,⁴ así como de cerebro de pacientes con epilepsia⁵ y enfermedad de Alzheimer.^{4,6} Como el lector podrá imaginarse, las implicaciones del desarrollo de este método pueden tener un gran alcance ya que permitirá estudiar en detalle no solo las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores y canales iónicos, sino que, además, permitirá entender mejor a nivel celular diversos desórdenes neurológicos como los mencionados arriba, aunque un problema real permanece: la implementación de estrategias para llevar a cabo esta tarea se encuentra limitada por la disponibilidad de tejidos para el estudio. En el caso del tejido cerebral, donde las membranas se aislaron de la corteza temporal de un paciente operado por epilepsia intratable, los microtransplantes permitieron caracterizar las propiedades de los receptores del paciente epiléptico con sus moléculas asociadas en su medio lipídico natural, lo que determina que este método que emplea tejidos frescos pueda ser de gran utilidad, ya que las membranas de los ovocitos, dentro de las dos primeras horas, adquirieron receptores funcionales para neurotransmisores del sistema nervioso central con características similares a las de los receptores sintetizados a partir de la inyección de RNA mensajero heterólogo. Por otro lado, el empleo de membranas obtenidas a partir de tejidos *post-mortem* de pacientes con enfermedad de Alzheimer (cerebros obtenidos dentro de las primeras cinco horas y almacenados en congelación entre uno y nueve años) arrojó resultados

similares: la técnica es adecuada para explorar proteínas de membrana insertadas dentro de su propio medio lipídico en un sistema de expresión de fácil acceso para el estudio como lo son los ovocitos de *Xenopus*.

Recientemente, Limón y colaboradores⁷ realizaron el microtransplante de receptores de membrana provenientes de cerebros de individuos autistas (*post-mortem*) a ovocitos de *Xenopus*; las muestras de tejido provinieron de bancos de cerebros que permanecieron congelados durante largo tiempo después de la muerte del paciente (dos a cinco años), por lo que resultó interesante determinar hasta qué grado los receptores expresados en estos tejidos permanecen funcionales. Cabe mencionar que el autismo, como patología neurológica, ha cobrado mucho interés debido al incremento en la incidencia de la enfermedad. Este padecimiento es cuatro veces más común en niños que en niñas y se presenta aproximadamente en uno de cada 150 niños en los Estados Unidos de América.⁸ Por ejemplo, en el estado de California, la incidencia de autismo ha alcanzado cifras alarmantes: hoy en día en este estado es más probable que un niño sufra de autismo que de leucemia y, sin embargo, las causas que producen la enfermedad son casi desconocidas. El estudio de Limón y colaboradores⁷ demuestra la expresión altamente preservada de receptores para diferentes neurotransmisores sin diferencias con respecto a lo encontrado para los receptores expresados en ovocitos a partir de la inyección de RNA mensajero proveniente de cerebros normales o autistas. Así, aun cuando los resultados no revelan diferencias moleculares entre los receptores de cerebros sanos y de autistas, el estudio demuestra fehacientemente que las proteínas de membrana humanas pueden ser estudiadas después de largos periodos de almacenaje *post-mortem*.

Aun cuando la comprensión de los procesos celulares que subyacen a condiciones fisiológicas (sano) y fisiopatológicas (cuando se sufre alguna alteración o desequilibrio que produce una enfermedad) queda como tarea para el futuro, la técnica de microtransplantes desarrollada por el grupo del doctor Miledi se vislumbra como una herramienta invaluable que permitirá no solo estudiar las propiedades de proteínas de membrana mantenidas en su propio entorno lipídico, sino además avanzar hacia la explicación a nivel celular de la fisiopatología de diversos desórdenes neurológicos.



© Luz María Genis.

REFERENCIAS

- ¹ Barnard EA, Miledi R y Sumikawa K. "Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus oocytes*". *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 215 (1982) 241-246.
- ² Phillips R, Ursell T, Wiggins P y Sens P. "Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function". *Nature*. 459 (2009) 379-385.
- ³ Marsal J, Tigyi G y Miledi R. "Incorporation of acetylcholine receptors and Cl⁻ channels in *Xenopus oocytes* injected with Torpedo electroplaque membranes". *Proc Natl Acad Sci USA*. 92 (1995) 5224-5228.
- ⁴ Miledi R, Dueñas Z, Martínez-Torres A, Kawas CH y Eusebi F. "Microtransplantation of functional receptors and channels from the Alzheimer's brain to frog oocytes". *Proc Natl Acad Sci USA*. 101 (2004) 1760-1763.
- ⁵ Miledi R, Eusebi F, Martínez-Torres A, Palma E y Trettel F. "Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus oocytes* after injection of human brain membranes". *Proc Natl Acad Sci USA*. 99 (2002) 13238-13242.
- ⁶ Bernareggi A, Dueñas Z, Reyes-Ruiz JM, Ruzzier F y Miledi R. "Properties of glutamate receptors of Alzheimer's disease brain transplanted to frog oocytes". *Proc Natl Acad Sci USA*. 104 (2007) 2956-2960.
- ⁷ Limon A, Reyes-Ruiz JM y Miledi R. "Microtransplantation of neurotransmitter receptors from postmortem autistic brains to *Xenopus oocytes*". *Proc Natl Acad Sci USA*. 105 (2008) 10973-10977.
- ⁸ Autism and developmental disabilities monitoring network. Disponible en <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss5601.pdf>

Angélica Almanza.
Instituto de Fisiología, BUAP.
e-mail: aalmanza75@yahoo.com

Francisco S. Mercado.
Instituto de Fisiología, BUAP, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz".
e-mail: mercado.aca@gmail.com