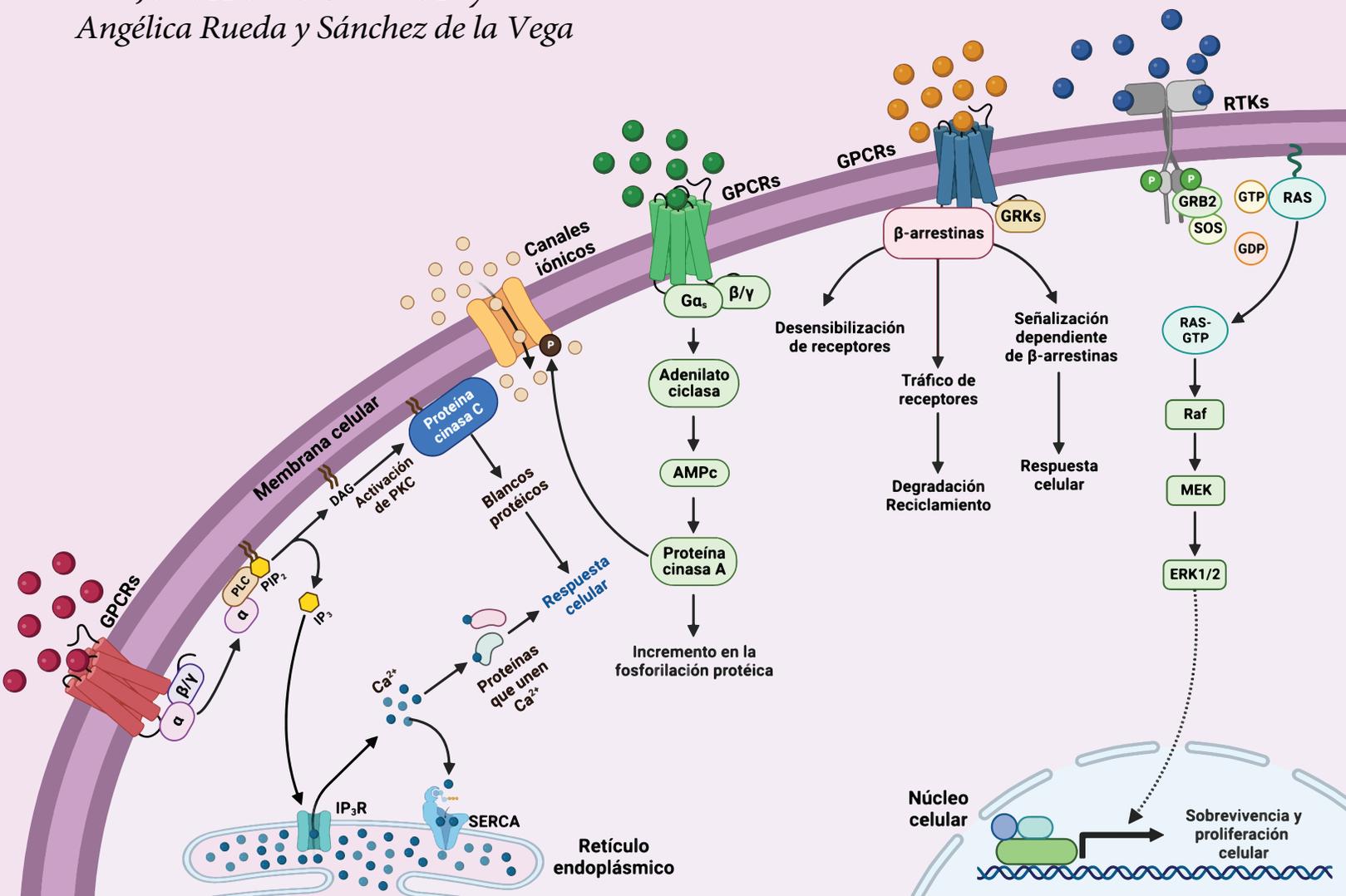


# Nuevas tendencias de investigación en la señalización celular en la era post-COVID

## Editores

Jesús Alberto Olivares Reyes  
Angélica Rueda y Sánchez de la Vega







Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN  
Sociedad Mexicana de Bioquímica  
Rama de Transducción de Señales

# **Nuevas tendencias de investigación en la señalización celular en la era post-COVID**

**Editores**

Jesús Alberto Olivares Reyes  
Angélica Rueda y Sánchez de la Vega

*Primera edición: 2023*

ISBN: 978-607-9023-78-2

D. R. 2023. Centro de Investigación y de Estudios  
Avanzados del IPN  
Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro  
Zacatenco, Gustavo A. Madero, 07360,  
Ciudad de México.

La figura de la portada fue creada con BioRender.

Impreso y hecho en México  
*Printed and made in Mexico*

*Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra,  
por cualquier medio, sin la autorización por escrito del  
titular de los derechos patrimoniales.*

---

## Contenido

<b>Presentación</b> .....	7
<b>Receptores de membrana y señalización celular</b>	
El Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona: más allá de sus acciones cardiovasculares y renales <i>Karla Daniela Hernández González y Jesús Alberto Olivares Reyes</i> .....	11
<b>Obesidad y Síndrome Metabólico</b>	
Síndrome metabólico: en la búsqueda de un biomarcador <i>Guadalupe Elena Donjuán Loredó y Ricardo Espinosa Tanguma</i> .....	31
Dimorfismo sexual en la resistencia a la insulina fisiológica y patológica en un modelo de síndrome metabólico en rata <i>Rosa Isela Ortiz-Huidobro, Myrian Velasco y Marcia Hiriart</i> .....	41
Efecto de la palmitoil-CoA sobre la liberación de citocromo c, un proceso clave de la apoptosis de las mitocondrias del hígado de ratas con obesidad <i>Miguel Ángel Barrios-Maya, Angélica Ruiz-Ramírez y Mohammed El-Hafidi</i> .....	51
<b>Proteínas y receptores intracelulares en la respuesta inmune y la inflamación</b>	
Las miosinas de clase 1 en los leucocitos y su importancia en la respuesta inmunológica <i>Leopoldo Santos Argumedo</i> .....	61
Papel de los receptores del sistema inmune innato en el progreso de las enfermedades cardiovasculares <i>Rafael I Jaén, Almudena Val-Blasco, Patricia Prieto, Marta Gil-Fernández, Andrea Bueno-Sen, Lisardo Boscá y María Fernandez-Velasco</i> .....	71
Efecto cardioprotector de la vitamina D en la insuficiencia cardíaca <i>María Tamayo, Laura Martín-Nunes, María José Piedras y Carmen Delgado</i> .....	87
<b>Nanodominios y señalización intracelular por Ca<sup>2+</sup></b>	
Señalización por calcio intracelular <i>Agustín Guerrero Hernández, Martín Leonardo Gallegos-Gómez, Ericka Martínez Martínez, Víctor Hugo Sánchez-Vázquez y Rodrigo Contreras-Gaytán</i> .....	99
Dominios de membrana: plataformas de señalización celular <i>Ulises Meza y Aldo A. Rodríguez-Menchaca</i> .....	123
Remodelado vascular: nuevos conceptos sobre el papel de los canales de calcio regulados por los reservorios <i>Marta Martín-Bórnez, Elisa Bevilacqua, Débora Falcón y Tarik Smani</i> .....	135
La importancia de la bomba SERCA en la regulación del calcio intracelular en los miocitos lisos vasculares en condiciones fisiológicas y patológicas <i>Cristian Julian Arriero-Carrillo, Rogelio Salazar-Enciso y Angélica Rueda</i> .....	145



## Presentación

El contenido de esta publicación es producto de nuestro interés por dejar testimonio escrito de una —de las muchas maneras— que ideamos los científicos para continuar trabajando y formando a las futuras generaciones de investigadores, a pesar de la pandemia producida por el virus SARS-CoV-2.

El 17 de marzo de 2020, la comunidad del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), recibió una comunicación oficial por parte del director general, el doctor José Mustre de León, que nos indicaba que de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y con la idea de mitigar la transmisión del COVID-19, se nos solicitaba que, a partir del 18 de marzo del 2020, acatáramos una gran cantidad de medidas de distanciamiento social, que incluían la restricción de reuniones presenciales con más de 20 personas, y la cancelación de cursos, congresos, y eventos académicos en general. En ese momento pensamos que estas restricciones serían por poco tiempo (tal vez una o dos semanas, como en una contingencia similar en 2009) desgraciadamente el periodo de aislamiento se prolongó hasta el momento en que iniciamos la organización del curso pre-congreso, asociado al VIII Congreso de la Rama de Transducción de Señales de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, planeado para finales de noviembre del 2021. Por lo que todo parecía indicar que teníamos solo dos opciones, o cancelar el curso o tomar ventaja del abanico de posibilidades que se nos abría, gracias a las múltiples plataformas en línea que nos permitirían invitar a ponentes de reconocida trayectoria internacional, nacionales y extranjero. Por lo que optamos por organizar el curso pre-congreso en línea a través de TEAMS, lo que no tan solo resultó accesible sino que nos permitió también tener asistentes de otras instituciones al interior y fuera de nuestro país.

Este libro es una compilación de 11 capítulos escritos en español, por líderes en cada una de las temáticas abordadas, con un lenguaje sencillo, los temas a tratar son: el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona; la obesidad y el Síndrome Metabólico; las proteínas y receptores intracelulares que participan en la respuesta inmune y la inflamación; y finalmente los nanodominios intracelulares y la señalización por calcio intracelular. Esta obra es el resultado de la entusiasta y amable participación de un total de 36 autores de México y España a quienes les agradecemos enormemente su trabajo, dedicación y paciencia. En especial a los autores responsables de los capítulos: Ricardo Espinosa Tanguma, Ulises Meza, Aldo A. Rodríguez-Menchaca (Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, SLP), María Fernández-Velasco (Instituto para la Investigación, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, España), Carmen Delgado (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid, España), Marcia Hiriart Urdanivia (Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, CDMX, México), Agustín Guerrero-Hernández, Angélica Rueda, Jesús Alberto Olivares Reyes (Departamento de Bioquímica, Cinvestav Zacatenco, CDMX, México), Leopoldo Santos-Argumedo (Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav Zacatenco, CDMX, México), Mohammed El-Hafidi (Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, CDMX, México) y Tarik Smani (Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, España).

Esta compilación surgió con la idea de servir como marco de referencia para que estudiantes de licenciatura y posgrado puedan acercarse a las líneas de investigación de transducción de señales intracelulares y señalización por calcio intracelular, mediante un lenguaje sencillo y claro, esperamos que este objetivo también lo estemos cumpliendo.

Finalmente, queremos comentar que se emplearon dos años para la recopilación y edición de los capítulos debido a que la preparación de cada uno consideró múltiples detalles, varias lecturas y discusiones para lograr la mejor calidad en su edición, por lo que esperamos que cumpla con las expectativas de los autores y los lectores.

En este espacio también queremos hacer patente nuestro agradecimiento a todos y cada uno de los autores, quienes confiaron en nosotros y tuvieron la paciencia y entereza suficiente para esperar —sin dudar o emitir queja alguna— en el proceso de la publicación del libro. A todos ellos, nuestro más sincero aprecio por su comprensión y simpatía para apoyar este proyecto. Al ingeniero Mario Medina Márquez y a la licenciada María Elena Ávila Urbina, les manifestamos nuestro más amplio reconocimiento por su magnífica labor como editores de la obra. A la Mesa Directiva de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, 2019-2021 quienes apoyaron sin dudar nuestra iniciativa de elaborar este documento. Por último, no podemos dejar de agradecer a las autoridades del Cinvestav, en especial al doctor Gabriel López Castro (Secretario Académico de este Centro, en 2020) quien consideró positivo el apoyo a este proyecto.

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes  
Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega



# Receptores de membrana y señalización celular



# El Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona: más allá de sus acciones cardiovasculares y renales

Karla Daniela Hernández González y Jesús Alberto Olivares Reyes\*

Laboratorio de Transducción de Señales, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

\* Autor para correspondencia:

Jesús Alberto Olivares Reyes, PhD.

Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN

Av. IPN 2508. Col. San Pedro Zacatenco, Ciudad de México, 07360, México

Teléfono: +52 (55) 5747-3951 e-mail: jolivare@cinvestav.mx

**Resumen:** El Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) es una cascada enzimática asociada a la síntesis de hormonas que participan en la regulación sistémica de la homeostasis cardiovascular y renal. Durante más de un siglo, se ha reconocido a RAAS por su papel fundamental en la regulación de la presión arterial y en la patogenia de enfermedades cardiovasculares. Fue considerado como un sistema endocrino sistémico y lineal, conformado por una serie de pasos enzimáticos consecutivos que culminaban con la producción de un solo metabolito biológicamente activo, la angiotensina II (Ang II). Se aceptó que, a través de la activación de sólo dos tipos de receptores de membrana, identificados como receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, la Ang II era la única hormona encargada de mediar las respuestas de RAAS. Sin embargo, en las últimas tres décadas se identificaron nuevos componentes de RAAS, incluidos diferentes péptidos bioactivos (Ang III, Ang IV, Ang 1-7, Ang A y alamandina), receptores distintos a los AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> (MasR, MrgDR, AT<sub>4</sub>R/IRAP y PRR), así como vías alternas de síntesis y procesamiento de la Ang II. Se reconoció la existencia de sistemas locales de RAAS en distintos órganos y tejidos. Estos hallazgos han permitido entender funciones de RAAS antes no reconocidas, como su participación en proliferación, apoptosis e inflamación. Además, se ha demostrado que la activación crónica de RAAS es crítica en distintas condiciones y patologías, como el cáncer, afecciones a nivel del sistema nervioso central, y desórdenes metabólicos. En el presente capítulo se describirán estas nuevas observaciones, así como su repercusión en diferentes condiciones y patologías de reconocida importancia clínica.

**Palabras clave:** Angiotensina II, angiotensina 1-7, sistema renina-angiotensina-aldosterona

## Abreviaturas

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina tipo 2
ACEs	Inhibidores de la ACE
AD	Aspartato descarboxilasa
AGT	Angiotensinógeno
ALDO	Aldosterona
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
APA	Aminopeptidasa A
APN	Aminopeptidasa N
ARBs	Antagonistas de los receptores AT <sub>1</sub>
ARDS	Síndrome de dificultad respiratoria aguda
AT <sub>1</sub> R	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT <sub>2</sub> R	Receptor de angiotensina II tipo 2
AT <sub>4</sub> R	Receptor de angiotensina II tipo 4
CRP	Proteína C reactiva
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
IL	Interleucina
IFN-γ	Interferón gamma
IR	Receptor de insulina
IRAP	Aminopeptidasa tipo II regulada por insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
LPS	Lipopolisacárido

LTP	Potenciación a largo plazo
MasR	Receptor Mas
MAPKs	Cinasas de proteína activadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MR	Receptor de mineralocorticoides
MrgDR	Miembro D del GPCR relacionado con Mas
NEP	Neprilisina
NF-κB	Factor nuclear-κB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKC	Cinasa de proteínas C
PLC	Fosfolipasa C
PRR	Receptor de prorenina-renina
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
SMet	Síndrome metabólico
SNC	Sistema Nervioso Central
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante-β1
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular

## 1. Introducción

El Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) constituye uno de los mecanismos endocrinos más complejos e importantes en

la regulación fisiológica de la función y homeostasis cardiovascular y renal. En este sistema participan diferentes enzimas en la generación de hormonas peptídicas funcionales con acciones biológicas muy diversas, acciones que se llevan a cabo a través de la activación de diferentes tipos de receptores. Sin embargo, en años recientes se han identificado funciones adicionales de RAAS a las ya reconocidas a nivel cardiovascular y renal, entre las que se encuentran acciones inflamatorias, metabólicas, proliferativas, neuroprotectoras y cognitivas [1, 2]. Además, se ha demostrado que alteraciones en el funcionamiento de RAAS pueden conducir al desarrollo de importantes padecimientos cardiovasculares, como la hipertensión arterial, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, insuficiencia e hipertrofia cardíaca, arritmias, disfunción endotelial, accidente cerebrovascular, así como diversos trastornos metabólicos y cáncer [3, 4]. Como consecuencia de ello, se han desarrollado diversos fármacos dirigidos a la regulación de RAAS, incluidos bloqueadores/antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> (ARBs), e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACEIs). En los últimos años, la identificación de componentes de RAAS en la infección por SARS-CoV-2, responsable de la pandemia actual, ha puesto de manifiesto nuevamente, la relevancia de este sistema más allá de sus acciones cardiovasculares y renales, lo que representa un reto para científicos y médicos.

## 2. Componentes de RAAS

A la fecha, se ha identificado que de todos los péptidos generados por la acción enzimática de RAAS, seis de ellos (Ang II, Ang 1-7, Ang III, Ang IV, Ang A y alamandina) actúan como mensajeros para diferentes tipos de receptores, los cuales ejercen diversas funciones, entre ellas: acciones metabólicas, proliferativas, inmunológicas e inflamatorias [5].

### 2.1. Componentes bioactivos de RAAS y sus receptores

#### 2.1.1. Angiotensina II

La Ang II, es considerada como el principal efector de RAAS, y se sintetiza a partir del angiotensinógeno (AGT) mediante escisiones enzimáticas secuenciales por acción de la renina y de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Específicamente, la renina escinde al AGT, formando el decapeptido Ang I que a su vez se convierte en Ang II por acción de la ACE (Figura 1) [2, 6]. Las acciones de la Ang II se ejercen a través de su unión a dos tipos de receptores transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs), identificados como receptores para Ang II tipo 1 y tipo 2 (AT<sub>1</sub>R y AT<sub>2</sub>R). El AT<sub>1</sub>R regula los efectos mejor caracterizados de la Ang II a nivel cardiovascular y renal, así como el crecimiento y la proliferación celular, la respuesta inflamatoria y el estrés oxidante. Este receptor se encuentra ampliamente distribuido en muchos tipos celulares y su señalización predominante es dependiente de la vía G<sub>q</sub>/PLC/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>, seguida por la rápida internalización del complejo Ang II/AT<sub>1</sub>R, la terminación de la señal dependiente de proteínas G<sub>q</sub> y la activación de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs),

Src, mTORC<sub>1</sub> y otras vías de señalización dependientes de las proteínas β-arrestinas, implicadas en el crecimiento, la supervivencia y la proliferación celular [1, 2].

Por el contrario, los efectos de la activación del AT<sub>2</sub>R por Ang II son menos conocidos. Se tiene evidencia experimental, que este receptor modula acciones dependientes de las proteínas Gi y de fosfatasas de tirosina para contrarrestar la mayoría de las respuestas celulares mediadas por el AT<sub>1</sub>R. Para ello, el AT<sub>2</sub>R inhibe el crecimiento y la proliferación celular y reduce la inflamación y el estrés oxidante, mientras que, por otra parte, promueve la diferenciación celular, la vasodilatación y la reducción de la presión arterial [7, 8]. En cuanto a su expresión, el AT<sub>2</sub>R se localiza de manera predominante en tejidos fetales y disminuye a lo largo del desarrollo del feto, para limitarse su expresión en órganos y tejidos adultos, principalmente en corazón, vasos, tronco encefálico, hígado y riñones, aunque esta puede aumentar bajo diferentes circunstancias patológicas [8].

#### 2.1.2. Angiotensina 1-7

El segundo péptido de relevancia de RAAS es la angiotensina 1-7 (Ang 1-7), considerado como el componente contrarregulador del RAAS clásico. La Ang 1-7 se genera a través de la escisión de la Ang II por acción de la enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ACE2), una monocarboxipeptidasa homóloga de la ACE [9]. Ang 1-7 también se puede sintetizar por otras dos vías alternas: 1) a través de la escisión de Ang I por acción de la neprilisina (NEP), y 2) por la ACE2 que escinde Ang I para generar angiotensina 1-9 (Ang 1-9), la cual a su vez se convierte en Ang 1-7 por acción de la ACE (Figura 1) [10-12].

Para ejercer sus efectos, la Ang 1-7 se une al protooncogén GPCR Mas1, reconocido comúnmente como receptor Mas (MasR), que al igual que los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, pertenece a los GPCRs. Ang 1-7/MasR median efectos depresores, vasodilatadores, anti-proliferativos, antioxidantes y antiinflamatorios [13]. Se ha reportado la expresión del MasR en órganos y tejidos como el corazón, el riñón, el pulmón, el hígado, el bazo, la lengua, el músculo esquelético y el cerebro [14], y se sabe que tiene una expresión elevada en el cerebro, mientras que en el corazón, el riñón, el endotelio y los vasos sanguíneos, su expresión es baja [15].

#### 2.1.3. Otros péptidos de RAAS

Otros péptidos de RAAS, formados a partir del AGT, presentan actividad biológica, incluida la Ang 1-9, la angiotensina III (Ang III), sintetizada a partir de Ang II por la aminopeptidasa A (APA), y la angiotensina IV (Ang IV) que resulta del catabolismo de Ang III por acción de la aminopeptidasa N (APN) [5]. Se ha descrito, por una parte, que tanto la Ang 1-9 como la Ang III ejercen acciones similares a las de Ang II/AT<sub>2</sub>R, ya que precisamente se unen con alta afinidad al AT<sub>2</sub>R, y por otra, que la Ang IV, a través de su unión al AT<sub>4</sub>R, promueve acciones antagónicas a la Ang II, como la vasodilatación, la producción de óxido nítrico (NO), la cardioprotección, así como efectos antifibróticos, antihipertróficos y antiinflamatorios [1, 16]. El AT<sub>4</sub>R es una proteína de mem-

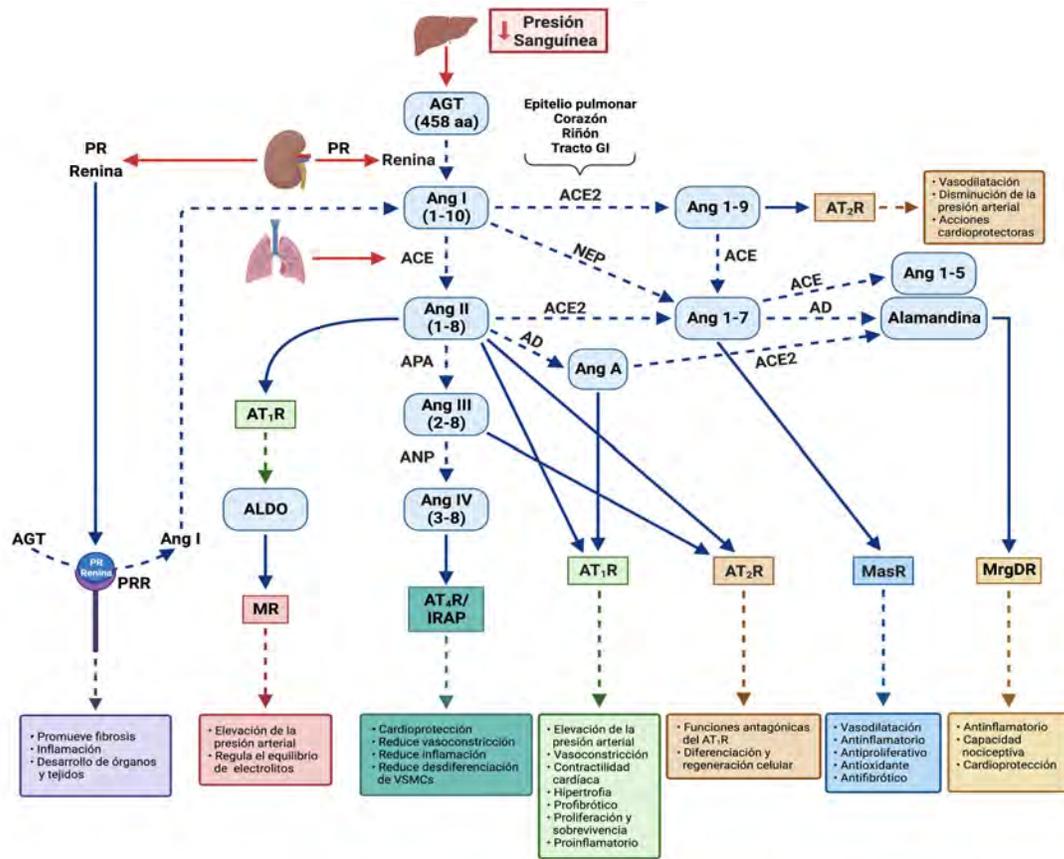


Figura 1. Componentes bioactivos de RAAS. RAAS está integrado por diferentes péptidos y receptores. El principal efector del sistema es la Ang II sintetizada a partir de AGT, escindido por renina y formando Ang I que posteriormente se convierte a Ang II por acción de la ACE2. Otros péptidos de la vía son formados a partir de Ang I y II por acción de ACE2 y las aminopeptidasas APA y APN. Estos péptidos llevan a la activación de varios receptores, además de los clásicos AT<sub>1</sub>R y AT<sub>2</sub>R; se pueden activar el PRR, MR, MasR y MrgDR. La activación de los receptores AT<sub>2</sub>R, AT<sub>4</sub>R, MasR y MrgDR funcionan como un eje contrarregulador a las acciones clásicas de la vía ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R, mientras que la activación de PRR y MR ejercen efectos similares al eje AT<sub>1</sub>R/Ang II. Las flechas con líneas discontinuas indican la formación de péptidos de RAAS y las enzimas involucradas. Las flechas con líneas discontinuas en color indican las diferentes acciones moduladas por los receptores de RAAS. Las flechas con líneas sólidas indican los receptores activados por los péptidos de RAAS. Las flechas con líneas sólidas rojas indican los péptidos secretados por el riñón, hígado y pulmón que participan como enzimas (renina, PR y ACE) o sustratos (AGT y PR) del sistema. ACE, enzima convertidora de angiotensina; ACE2, enzima convertidora de angiotensina tipo 2; AD, aspartato descarboxilasa; AGT, angiotensinogeno; ALDO, aldosterona; Ang I, angiotensina I; Ang 1-7, angiotensina 1-7; Ang 1-9, angiotensina 1-9; Ang II, angiotensina II; Ang III, angiotensina III; Ang IV, angiotensina IV; APA, aminopeptidasa A; APN, aminopeptidasa N; AT<sub>1</sub>R, receptor de angiotensina II tipo 1; AT<sub>2</sub>R, receptor de angiotensina II tipo 2; AT<sub>4</sub>R, receptor de angiotensina II tipo 4; GI, gastrointestinal; MasR, receptor Mas; MR, receptor de mineralocorticoides; MrgDR, miembro D del GPCR relacionado con Mas; NEP, neprilisina; PR, prorenina; PRR, receptor de prorenina-I renina; RAAS, sistema renina-angiotensina-aldosterona. Imagen elaborada con BioRender.com.

brana con actividad de aminopeptidasa tipo II regulada por insulina (IRAP), cuya expresión, a diferencia de los otros receptores de angiotensina, se encuentra restringida a ciertas regiones del cerebro, particularmente de la corteza, el hipocampo y los ganglios basales. La activación de los AT<sub>4</sub>Rs por Ang IV mejora la cognición, la transmisión de señales celulares, la remodelación sináptica y se le han reconocido propiedades antioxidantes (Figura 1) [17, 18].

Se han identificado, además, otros péptidos de angiotensina como la angiotensina A (Ang A), generada a partir de Ang II por la aspartato descarboxilasa (AD), y la alamandina, sintetizada a partir de Ang A por acción de la ACE2 o a partir de Ang 1-7 por acción de la AD [19]. Ambos péptidos llevan a cabo funciones comunes de

RAAS a nivel cardiovascular y renal. Mientras que la Ang A ejerce acciones similares a Ang II/AT<sub>1</sub>R, debido a que se une precisamente a los AT<sub>1</sub>R, la alamandina lleva a cabo acciones biológicas similares a las de la Ang 1-7, contrarrestando las acciones adversas de Ang II y Ang A, a través de la activación del receptor miembro D del GPCR relacionado con Mas (MrgDR) (Figura 1) [19].

El receptor MrgD es un GPCR con alta homología estructural y funcional al MasR. Originalmente se identificó en neuronas sensoriales nociceptivas primarias en roedores y humanos; sin embargo, estudios posteriores demostraron su expresión en diversos tipos celulares de órganos y tejidos como cardiomiocitos, arterias, tejido adiposo blanco y marrón, piel, cerebelo, tráquea,

timo, pulmón, diafragma, músculo esquelético, vejiga urinaria, útero, testículo, próstata, y vesícula seminal [20]. En cuanto a la señalización mediada por alamandina/MrgDR, ésta es la menos caracterizada de los diferentes péptidos bioactivos de RAAS. Sin embargo, al identificársele acciones contrarreguladoras al eje Ang II/AT<sub>1</sub>R, y semejantes a las acciones mediadas por Ang 1-7/MasR, se ha propuesto que la estimulación del MrgDR por alamandina activa vías de señalización involucradas en cardioprotección, vasodilatación (antihipertensivo), así como efectos antihipertróficos, antiinflamatorios y antifibróticos (Figura 1) [5, 20, 21].

Aunque la renina es considerada como la enzima limitante en la síntesis de todos los péptidos efectores de RAAS, a principios del siglo XXI surgió evidencia experimental de que la renina y su precursor, prorenina, participan como péptidos bioactivos de RAAS. En este sentido, un hallazgo muy importante fue el descubrimiento de un receptor para ambos péptidos. Este receptor, identificado como receptor de prorenina-renina (PRR), al ser activado por ambos péptidos regula vías de señalización que contribuyen a la regulación de la presión arterial y el volumen de líquidos. Sin embargo, evidencia cada vez mayor sugiere que la función del PRR no se limita al control de la presión arterial; también puede modular la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, y la función de la ATPasa de protones de tipo vacuolar, dos vías involucradas en el desarrollo de órganos y tejidos (Figura 1) [22, 23].

El PRR es una proteína transmembranal de 350 aminoácidos (aa), la cual presenta un extenso dominio N-terminal extracelular, y se ha identificado como un receptor para la renina en su forma activa, y para la prorenina, en su forma inactiva [24]. En este contexto, se ha mostrado que al unirse al PRR la actividad enzimática de la renina aumenta hasta 5 veces más que la actividad de la renina que no se une al receptor, y que la unión al PRR induce un cambio conformacional en la prorenina que libera estructuralmente al sitio catalítico, lo que resulta en la activación no proteolítica completa de la prorenina y en consecuencia una mayor tasa de proteólisis de AGT y de síntesis de Ang II [24].

El aumento en la expresión del PRR en células de músculo liso vascular está asociado a síntomas de hipertensión y al aumento de aldosterona (ALDO) en plasma, lo que sugiere su participación en la fisiopatología de la hipertensión arterial [24]. Cabe mencionar que, bajo condiciones normales, el PRR está expresado abundantemente en cerebro, placenta, tejido cardíaco y sistema inmune, mientras que en riñón y en hígado su expresión es más limitada. Además, se ha descrito que su eliminación en modelos knockout (KO) de ratón afecta el desarrollo embrionario, y puede conducir a problemas de insuficiencia cardíaca a temprana edad [12, 23].

#### 2.1.4. Aldosterona

En cuanto a las acciones de la ALDO, es bien reconocido que esta hormona se sintetiza en las glándulas suprarrenales por acción de Ang II/AT<sub>1</sub>R y se regula negativamente por Ang 1-7, de forma que la producción y actividad de ALDO está regulada por el equilibrio entre Ang II/Ang 1-7 [25]. Participa en la homeostasis renal del sodio y en la regulación de la presión arterial, acciones que se llevan a cabo por la activación del receptor de mineralocorti-

coides (MR) (Figura 1). El MR pertenece a la familia de receptores intracelulares, actuando como un factor transcripcional dependiente de ligando [26, 27]. Sin embargo, el MR también desempeña un papel importante en funciones cardiovasculares y metabólicas y se ha localizado en el corazón, el tejido adiposo, células endoteliales, el músculo liso vascular, y en cerebro [26, 27]. Tras la unión de ALDO, el MR se traslada al núcleo regulando cambios en la expresión génica de los tejidos y órganos blanco [27, 28].

La sobreactivación de la vía de ALDO/MR se asocia al desarrollo de hipertensión, insuficiencia cardíaca, daño vascular, así como trastornos de tipo metabólico. El aumento en la secreción de ALDO junto con la sobreestimulación del AT<sub>1</sub>R conduce a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de la NADPH oxidasa, contribuyendo a diversas patologías cardíacas y vasculares [27].

De acuerdo con lo antes descrito, y con base en los péptidos efectores de RAAS y sus receptores, se pueden identificar claramente dos ejes o ramas principales del sistema: una asociada a las acciones clásicas de RAAS, representada por ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R (eje clásico), y en el que también se incluyen a Ang A/AT<sub>1</sub>R, y a renina/prorenina/PRR. Esta rama se encarga de los efectos vasopresores, tróficos, proinflamatorios, fibróticos, y oxidantes de RAAS. El segundo eje, contrarregulador de las acciones del eje Ang II/AT<sub>1</sub>R, está compuesto por ACE2/Ang 1-7/MasR, e incluye a Ang II/AT<sub>2</sub>R, Ang III/AT<sub>2</sub>R, Ang 1-9/AT<sub>2</sub>R, Ang IV/AT<sub>4</sub>R y a alamandina/MrgDR (Figura 1) [5, 29].

#### 2.2. Heterodímeros de receptores: nuevos componentes en la señalización de RAAS

La interacción y comunicación cruzada entre hormonas y sus receptores constituyen uno de los principales mecanismos de integración y regulación de respuestas fisiológicas en un organismo. En este contexto, los GPCRs representan la familia de referencia en la que las interacciones funcionales y físicas entre receptores para diferentes ligandos (heteromerización) han sido bien establecidas tanto *in vivo* como *in vitro* [30, 31].

La heteromerización de receptores da como resultado una farmacología particular y una huella dactilar de señalización específica con potenciales implicaciones fisiológicas y fisiopatológicas [30]. En este sentido, los receptores de RAAS constituyen el mejor ejemplo de referencia en la familia de los GPCRs, ya que estos interactúan funcional y/o físicamente con diversos tipos de receptores tanto GPCRs como de otros tipos [30, 32]. La formación potencial y funcional de heterodímeros entre los diferentes receptores de RAAS representan nuevos mecanismos para la diversificación de su señalización [1, 16, 32]. En este contexto, el AT<sub>1</sub>R interacciona de manera independiente con los receptores Mas (AT<sub>1</sub>R/MasR) y AT<sub>2</sub> (AT<sub>1</sub>R/AT<sub>2</sub>R), para formar receptores heterodiméricos que directamente antagonizan e inactivan al receptor AT<sub>1</sub>, llevando a una disminución en sus vías de señalización [33, 34]. Adicionalmente, se demostró la formación de heterodímeros entre los receptores AT<sub>2</sub> y Mas (AT<sub>2</sub>R/MasR), que se sugiere dependen uno de otro para antagonizar la señalización mediada por Ang II/AT<sub>1</sub>R (Figura 2) [35].

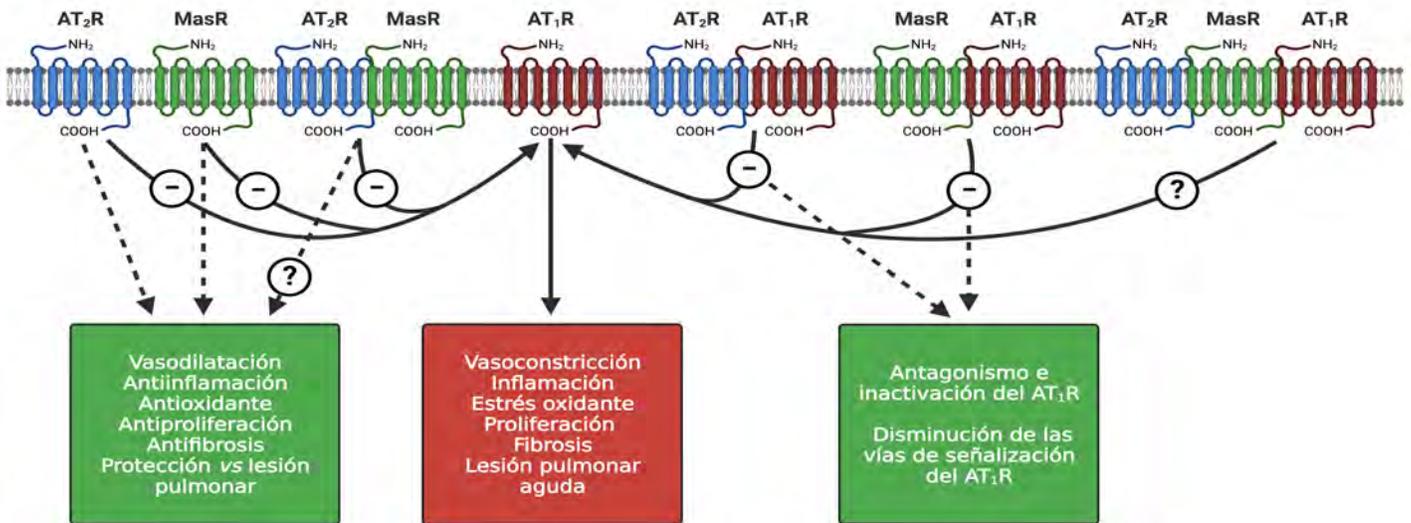


Figura 2. Heteromerización de receptores de RAAS. Los receptores de RAAS pueden interactuar funcional y físicamente con otros receptores de la misma familia, formando heterómeros que diversifican las funciones de los ligandos, y permiten antagonizar la señalización clásica de Ang II/AT<sub>1</sub>R. En el esquema se muestran, mediante líneas sólidas, los receptores que pueden interactuar entre sí y promueven la regulación negativa (-) de la activación del AT<sub>1</sub>R. La activación independiente de los AT<sub>2</sub>R y MasR promueven la señalización de vías que conllevan a respuestas contrarias a las mediadas por Ang II/AT<sub>1</sub>R (líneas discontinuas, ----). Por otra parte, la formación de los heterodímeros AT<sub>2</sub>R/AT<sub>1</sub>R y MasR/AT<sub>1</sub>R pueden antagonizar e inactivar al AT<sub>1</sub>R o disminuir su señalización (líneas discontinuas, ----). En cuanto a los heterodímeros de AT<sub>2</sub>R/MasR, se ha sugerido que ambos podrían antagonizar la señalización mediada por Ang II/AT<sub>1</sub>R, aunque los mecanismos no han sido del todo elucidados (líneas discontinuas más signo de interrogación, ----?-----). Se ha propuesto la formación de heterooligómeros funcionales entre AT<sub>1</sub>R/AT<sub>2</sub>R/MasR, con implicaciones fisiológicas relevantes en las acciones de los AT<sub>1</sub>Rs (línea continua con símbolo de interrogación). AT<sub>1</sub>R, receptor de angiotensina II tipo 1; AT<sub>2</sub>R, receptor de angiotensina II tipo 2; MasR, receptor Mas. Imagen elaborada con BioRender.com.

En el caso de los heterodímeros de AT<sub>1</sub>R/AT<sub>2</sub>R, la regulación negativa del receptor AT<sub>1</sub> requiere de la fosforilación del receptor AT<sub>2</sub> dependiente de la cinasa de proteínas C (PKC). De esta forma, la transducción de señales puede variar en función de la composición de los receptores diméricos y de los mecanismos requeridos para dicha interacción (Figura 2) [1].

Finalmente, evidencia experimental indirecta sugiere la formación de heterooligómeros funcionales y con implicaciones fisiológicas relevantes entre los receptores AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub>/Mas, que nuevamente evidenciarían la complejidad de los mecanismos reguladores de la actividad de RAAS (Figura 2) [32, 36].

### 3. RAAS sistémico y RAAS local

#### 3.1. RAAS sistémico o circulante

Inicialmente, RAAS fue identificado como un sistema multienzimático endocrino, en el que la síntesis de las hormonas del sistema depende de la acción de distintas enzimas producidas en múltiples órganos y tejidos. Así, este sistema que, en respuesta a diferentes tipos de señales conlleva a la regulación de la presión arterial, se inicia con la liberación de la enzima renina, una aspartil proteasa que se produce y secreta por las células yuxtarglomerulares del riñón [37, 38]. La renina se sintetiza inicialmente en forma del precursor prorenina, de 402 aa, del cual se eliminan 43

aa del extremo N-terminal por acción de la prohormona convertasa PC5 y de la catepsina B [38]. Una vez sintetizada y secretada a la circulación, la renina escinde al AGT, una  $\alpha$ 2-globulina de 452 aa que se produce y secreta por el hígado, para generar Ang I en circulación, la cual es entonces proteolizada para generar Ang II por acción de la ACE, predominantemente expresada en la superficie de las células endoteliales del pulmón [10, 29].

Una vez generada en la circulación pulmonar, y a través de su distribución por el torrente sanguíneo, la Ang II actúa sobre distintos órganos y tejidos blanco en donde ejerce sus acciones a través de los AT<sub>1</sub>R y AT<sub>2</sub>R. De esta forma, este sistema endocrino tradicional es un mecanismo de reacción rápida que tiene como objetivo restaurar de manera general el volumen intravascular, el equilibrio de electrolitos y la perfusión de órganos vitales.

#### 3.2. RAAS local o tisular

Numerosas evidencias experimentales han demostrado la existencia de un RAAS generado localmente, en el cual múltiples componentes del RAAS circulante, incluyendo al eje ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R, además de la renina y el AGT, se sintetizan de novo en tejidos y órganos de manera independiente a la síntesis sistémica anteriormente descrita. Adicionalmente, se identificaron otras enzimas locales que participan en la síntesis de Ang II a partir de AGT, como la catepsina G y D, la quimasa y la tonina [29]. También se evidenció que la Ang II ejerce sus acciones en los órganos

que la sintetizan a través de mecanismos autocrinos y paracrinos. Así, se han documentado sistemas locales de RAAS en diferentes órganos y tejidos como el cerebro, el corazón, el riñón, el tejido adiposo y muscular, las glándulas suprarrenales y la piel, además del hígado, riñón y pulmón, que participan en el RAAS sistémico [29].

Por otra parte, también se han reconocido distintos componentes y mecanismos locales de RAAS que contribuyen a la formación de otros péptidos de angiotensina (además de Ang II), que pueden participar en procesos fisiológicos, como los mecanismos de protección tisular, o patológicos, como la enfermedad cardiovascular, el cáncer y la resistencia a la insulina [39]. Entre estos se incluyen al eje ACE2/Ang 1-7/MasR, la expresión tanto de los AT<sub>2</sub>Rs como de los PRRs [40], al igual que la generación de péptidos de angiotensina a partir de mecanismos independientes de la participación de renina, por ejemplo a partir de AGT/caliceína/Ang 1-12 [39]. Además, se ha identificado la síntesis de otros péptidos de RAAS con una farmacología distinta a la reportada para Ang II y Ang 1-7, incluidos Ang III, Ang IV, Ang A, y alamandina [19], que tienen el potencial de contribuir al desarrollo de enfermedades o a mecanismos de protección.

Uno de los RAAS locales de mayor interés en la actualidad es el RAAS local del cerebro. Este sistema desempeña un papel esencial en el desarrollo de las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, principalmente a través de las vías ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R y renina-prorenina/PRR. Adicionalmente, existe evidencia de que otras vías locales de RAAS, como ACE2/Ang 1-7/MasR y Ang IV/AT<sub>4</sub>R, pueden ejercer efectos neuroprotectores, participar en la facilitación cognitiva y de memoria, y contrarregular las acciones de Ang II y renina/prorenina [18, 41].

Finalmente, y no menos significativa, es la evidencia de la producción local de ALDO en diferentes tejidos, como en corazón, cerebro y riñón, en donde su síntesis se ha asociado a la presencia de RAAS local y es independiente del RAAS sistémico, por lo que la inclusión de la ALDO dentro del RAAS local se justifica plenamente [28, 42]. De esta forma, la amplia distribución de RAAS debido a su presencia y señalización a nivel local, permite entender su estrecha asociación con condiciones patológicas tales como el cáncer, la inflamación, la resistencia a la insulina y las enfermedades neurodegenerativas.

#### 4. RAAS y sus acciones clásicas a nivel cardiovascular y renal

Por más de una centuria se ha establecido el papel sustancial de RAAS en la fisiología cardiovascular, mediante sus acciones en la regulación de la presión sanguínea y el balance de electrolitos, además de su reconocida participación en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares (Figura 3) [5, 37, 43]. Es por medio del eje ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R, considerado el brazo vasoconstrictor de RAAS, por el que se regula la presión arterial mediante múltiples mecanismos, entre los que se incluyen la vasoconstricción, la reabsorción de sodio, la activación simpática e inmunitaria, el aumento en la secreción de ALDO, el estrés oxidante y la fibrosis e inflamación [37, 43].

Aunque RAAS cumple funciones fisiológicas críticas, la activación crónica del eje ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R conduce al desarrollo

de alteraciones cardiovasculares de mucha relevancia, como arritmias cardíacas, hipertensión, enfermedad de arterias coronarias e insuficiencia cardíaca crónica [43].

Por otro lado, el exceso de ALDO también constituye un factor de riesgo cardiovascular, no solo para el desarrollo de hipertensión sino además para el accidente cerebrovascular, la enfermedad de las arterias coronarias, la insuficiencia cardíaca congestiva y la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Se ha demostrado que la ALDO induce disfunción y remodelación vascular, aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y promueve inflamación. En este contexto, la inflamación o activación del sistema inmunitario juega un papel crítico en la fisiopatología de la hipertensión y el daño vascular promovido por la ALDO [44, 45].

Para contrarrestar las acciones del eje Ang II/AT<sub>1</sub>R, la Ang II se une a los AT<sub>2</sub>Rs para neutralizar la mayoría de los efectos del AT<sub>1</sub>R, promoviendo la vasodilatación y reduciendo la inflamación y el estrés oxidante, además de inhibir la proliferación y diferenciación celular. En el riñón, la activación del AT<sub>2</sub>R también se opone a las acciones vasoconstrictoras del AT<sub>1</sub>R al promover la dilatación de las arteriolas aferentes y eferentes [7].

Otro mecanismo homeostático decisivo que contrarregula las acciones cardiovasculares de Ang II/AT<sub>1</sub>R, es mediante la activación del eje ACE2/Ang 1-7/MasR, el cual tiene una función crítica en la homeostasis cardiovascular y la cardioprotección, mediante la activación de mecanismos vasculares, cardíacos y renales [43, 46], por lo que alteraciones en la expresión o función de sus componentes se asocian a la patogenia de enfermedades cardiovasculares [25, 43, 47].

En cuanto a la participación de RAAS en la función renal, este desempeña acciones vitales para el control de la hemodinámica renal (Figura 3). Entre las principales acciones mediadas por el eje Ang II/AT<sub>1</sub>R, se encuentran la reducción de la excreción renal de sodio a través de alteraciones en la hemodinámica renal, la reabsorción de sodio en el túbulo contorneado proximal, y provocar un aumento en la reabsorción de sodio y la excreción de potasio en el túbulo distal y el conducto colector de la nefrona por acción de la ALDO [48, 49]. Además, la Ang II aumenta la sed, la ingesta de sal y la absorción intestinal de sodio. El efecto neto de todas estas acciones es el aumento del nivel de reabsorción de sodio corporal total que conduce a un incremento en la osmolaridad y a un consiguiente aumento en el volumen de sangre y líquido extracelular, lo que promueve la elevación de la presión arterial [49]. Sin embargo, cada vez existe una mayor evidencia experimental y clínica de que, además de la Ang II, la Ang 1-7 también desempeña funciones fisiológicas críticas en el control del equilibrio hidroelectrolítico, principalmente a través de su actividad en el riñón [48, 49]. En este contexto, se ha evidenciado, mediante el uso de ratones KO para el receptor Mas (MasR<sup>-/-</sup>), que la carencia de este receptor genera un desequilibrio de RAAS, lo que conduce a un predominio anormal del eje ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R. En consecuencia, los ratones MasR<sup>-/-</sup> presentan retención de sodio y agua, fibrosis e inflamación renal, hiperfiltración glomerular, proteinuria y tendencia a la glomeruloesclerosis [50].

Por otra parte, Ang II también actúa sobre la corteza suprarrenal, específicamente sobre la zona glomerulosa, en donde estimula

la liberación de ALDO. La ALDO es una hormona esteroide que al unirse a los MRs promueve la transcripción génica, por lo que sus efectos pueden tardar de horas a días en hacerse presentes, mientras que los efectos de la Ang II son rápidos [49]. Asimismo, se ha reportado que la supresión del MR provoca reducción en los volúmenes de orina, reducción del flujo sanguíneo renal y de la retención de sodio; por otra parte, estudios en animales con esta deficiencia han mostrado reducción en el diámetro glomerular y un aumento de los AT<sub>1</sub>Rs a nivel renal [50, 51].

### 5. Acciones de RAAS más allá de sus efectos cardiovasculares y renales

#### 5.1. RAAS y el Sistema Nervioso

Trabajo clínico y experimental sugiere la existencia de un RAAS local en el cerebro y en el sistema nervioso central (SNC), encargado de regular centralmente la presión arterial sistémica, así como el flujo sanguíneo cerebral, mediante funciones paracrinas, autocrinas e intracrininas, independientes de las de la Ang II circulante, la cual tiene un acceso limitado al cerebro debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (BH). La BH limita el acceso de la Ang II, como la de todos los componentes periféricos de RAAS, a la mayoría de las regiones del cerebro, lo que conlleva

a la necesidad de la síntesis local de un RAAS cerebral [52].

En particular, se ha reportado que Ang II/AT<sub>1</sub>R local ejerce potentes efectos en el cerebro que elevan, de forma sinérgica, el volumen sanguíneo y la presión arterial, debido al estímulo de la ingesta de agua y el apetito por la sal, la liberación de diversas hormonas hipofisarias, el aumento del tono simpático y la disminución del reflejo barorreceptor [53, 54]. Adicionalmente, se ha evidenciado que Ang II/AT<sub>1</sub>R no solo participa en la regulación de la presión arterial, sino también en la modulación de múltiples funciones adicionales en el cerebro, como la temperatura corporal y la actividad locomotora, así como la memoria, el comportamiento sexual, el aprendizaje y la regulación de respuestas emocionales (Figura 3) [55].

Debido a las importantes acciones que RAAS desempeña en el SNC, se ha demostrado que la activación excesiva del eje ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R provoca vasoconstricción de vasos sanguíneos que reduce la microcirculación cerebral, y promueven inflamación que causa neurodegeneración. Además, la activación constante del eje se relaciona con un aumento significativo del estrés oxidante, apoptosis y neuroinflamación, asociados a la neurodegeneración presente en varios tipos de trastornos cerebrales tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, demencia, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, lesión cerebral traumática y accidente cerebrovascular [13, 56]. Lo anterior se ha corroborado mediante

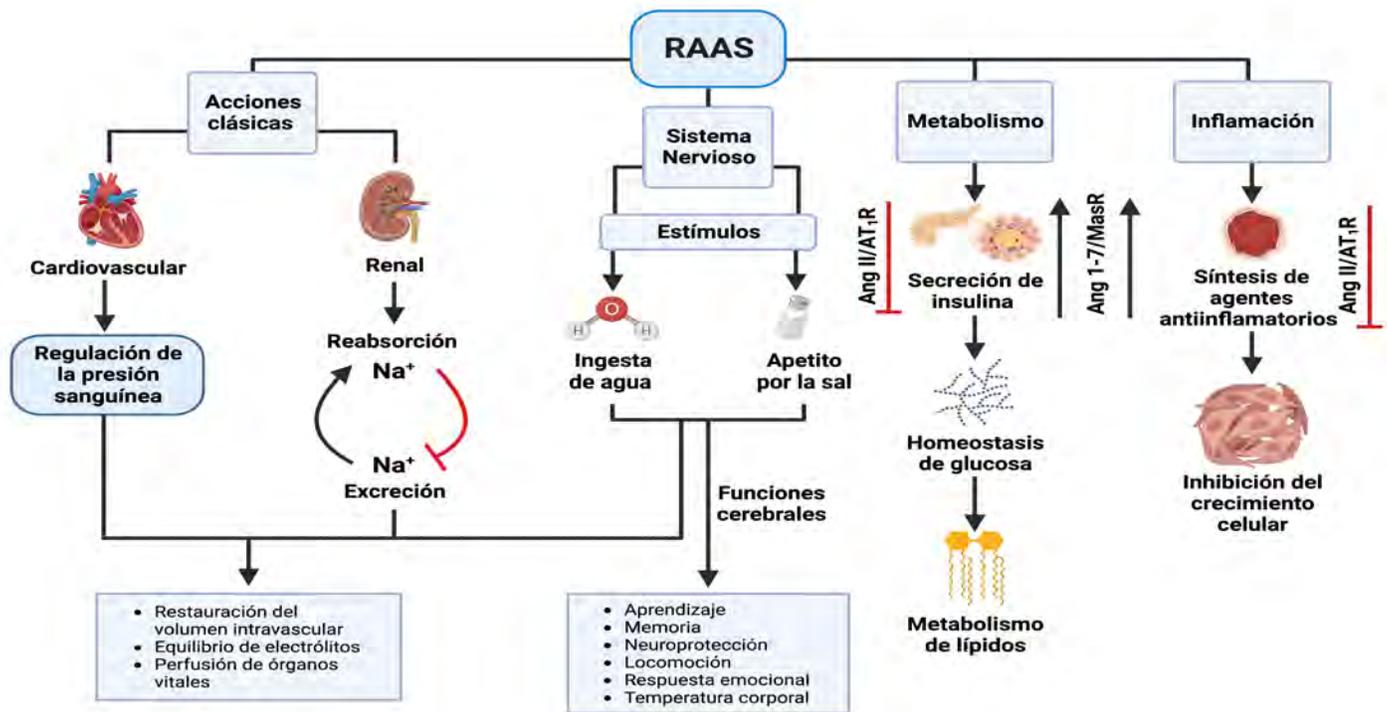


Figura 3. RAAS sistémico y local. Las acciones clásicas de RAAS se llevan a cabo a través de distintas enzimas producidas en varios órganos y tejidos del organismo. La regulación de la presión sanguínea es consecuencia de acciones que se llevan a cabo de forma específica en sistemas distintos al cardiovascular. En el riñón la reabsorción de sodio e inhibición de su excreción, y en el sistema nervioso la estimulación de apetito e ingesta de agua contribuyen a esta regulación. Por otra parte, en otros órganos y tejidos RAAS cumple funciones locales como el aprendizaje, la locomoción, regulación metabólica de azúcares y lípidos, procesos de inflamación, entre otros. Ang II, angiotensina II; Ang 1-7, angiotensina 1-7; AT<sub>1</sub>R, receptor de angiotensina tipo 1; MasR, receptor Mas. Imagen elaborada con BioRender.com.

el empleo de ARBs y la activación del eje ACE2/Ang 1-7/MasR, ya que ambos contrarrestan los efectos perjudiciales del eje ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R, además de ejercer efectos neuroprotectores [56, 57].

En los últimos años, el eje ACE2/Ang 1-7/MasR ha recibido particular interés debido a que su activación regula funciones cerebrales críticas, entre las que se incluyen el aprendizaje, la memoria y la neuroprotección. Existe evidencia de que Ang 1-7/MasR aumenta la producción de NO cerebral a través de la activación de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). La producción de NO neuronal se considera como un paso fundamental en la memoria de reconocimiento de objetos y la potenciación a largo plazo (LTP, un proceso mediante el cual las conexiones sinápticas entre las neuronas se fortalecen con la activación frecuente) en el hipocampo y la amígdala [57-59]. En este sentido, ratones MasR<sup>-/-</sup>

presentan una memoria de reconocimiento de objetos deficiente, lo que destaca el papel necesario de Ang 1-7/MasR en el aprendizaje y la memoria [57, 60]. Además, Ang 1-7 podría tener un efecto neuroprotector importante contra el accidente cerebrovascular isquémico. Por otra parte, los efectos antioxidantes del eje Ang 1-7/MasR ayudan a mantener la función endotelial normal en los vasos cerebrales [57].

Otro péptido de RAAS con importantes acciones a nivel cerebral es la Ang IV. Se ha establecido que Ang IV/AT<sub>4</sub>R, facilitan la LTP, el aprendizaje y la memoria, y aumenta el flujo sanguíneo cerebral que depende de la síntesis y liberación de NO de las células endoteliales vasculares [55].

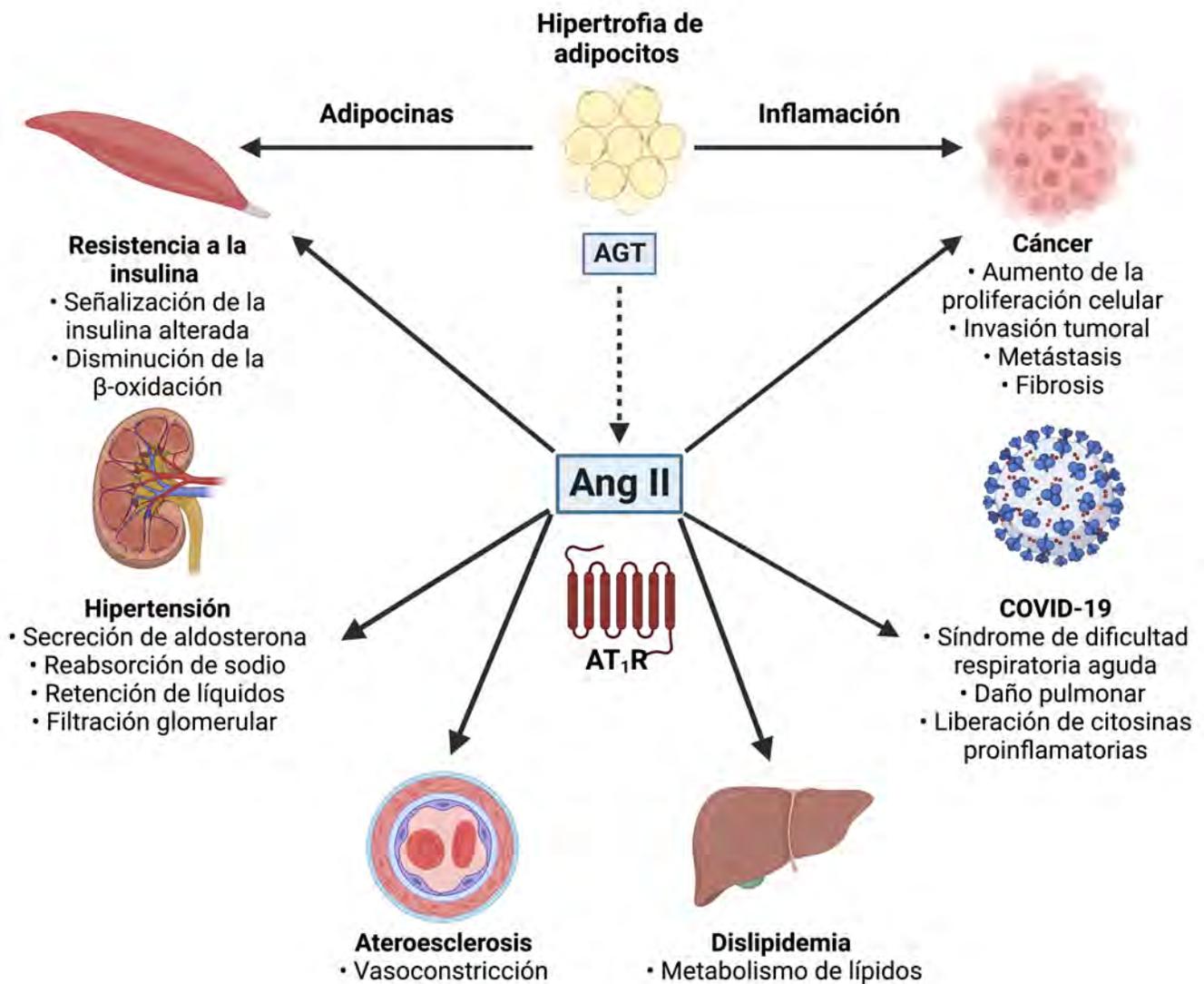


Figura 4. Patologías asociadas a la desregulación RAAS. La sobre activación de la vía ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R se ha asociado al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como en la DM2, en la cual se presentan procesos de inflamación, resistencia a insulina, e hipertensión, en el cáncer incremento de la proliferación celular y metástasis y también tiene un papel relevante en el síndrome de dificultad respiratoria aguda causado por SARS-CoV-2.

AGT, angiotensinogeno; Ang II, angiotensina II; AT<sub>1</sub>R, receptor de angiotensina tipo 1. Imagen elaborada con BioRender.com.

## 5.2. RAAS en el metabolismo

En las últimas décadas se ha determinado que RAAS desempeña un papel relevante en la regulación del metabolismo y el balance energético, por lo que perturbaciones en este sistema se asocian al desarrollo de alteraciones de tipo metabólico, como el síndrome metabólico (SMet), la resistencia a la insulina, la obesidad y la DM2 [61-63]. Se ha establecido que la activación de RAAS locales en tejidos y órganos sensibles a la insulina, como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo, está estrechamente relacionada con el desarrollo de dichas alteraciones, particularmente a través del eje ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R (Figura 4) [64, 65]. Entre los principales mecanismos activados por este eje que conducen a alteraciones metabólicas, incluyen al estrés oxidante, al estrés del retículo, al estrés mitocondrial y su participación en el desarrollo de un estado inflamatorio sistémico [64, 66].

En el caso de la resistencia a la insulina, definida comúnmente como una disminución en la sensibilidad o capacidad de respuesta celular a las acciones metabólicas de la insulina, un factor crítico que contribuye a su desarrollo es la hiperfosforilación de residuos de serina/treonina del receptor de insulina (IR) y del sustrato del receptor de insulina (IRS), lo cual reduce la activación de la vía PI3K/Akt, principal involucrada en las acciones metabólicas de la insulina, entre las que se incluyen la incorporación de la glucosa a través de transportadores de glucosa tipo 4 [64-66]. En relación con esto, se ha descrito que Ang II induce resistencia a la insulina a través de la activación de cinasas de proteínas, como PKC y MAPKs, que fosforilan en residuos de serina/treonina a IR/IRS y afectan las acciones de insulina, tanto en el sistema cardiovascular como en tejidos metabólicos [64-68]. Además, por medio de la activación de fosfatasa de proteínas de tirosina (PTPs), Ang II altera la fosforilación en tirosinas del IR, crítica para su activación, y mediante la síntesis del supresor de señalización de citocinas-3 (SOCS-3) se reduce la interacción IR/IRS [64]. Lo anterior ha sido confirmado a través del uso de ACEIs y ARBs que mejoran notablemente la homeostasis de la glucosa y lípidos y previenen el desarrollo de DM2 en pacientes con problemas cardiovasculares [64, 69, 70].

Otro hallazgo muy importante, fue el hecho de que bajo condiciones de obesidad el RAAS local del tejido adiposo es el responsable del aumento en la síntesis y secreción de Ang II, junto con otras adipocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), IL-18 e IL-1 $\beta$ , las cuales actúan tanto a nivel local como sistémico para promover la resistencia a la insulina y disminuir su secreción por las células  $\beta$ -pancreáticas [66]. Adicionalmente, se ha identificado que, en islotes pancreáticos hipertrofiados, existe un aumento en los niveles del AT<sub>1</sub>R que al ser activado por Ang II, se estimula la producción de ROS y conduce a un estado de estrés oxidante, promoviendo fibrosis y apoptosis que contribuye a la disfunción de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans [71, 72].

Además de Ang II, otros péptidos de RAAS, particularmente ALDO y renina/prorenina, se han asociado a alteraciones en la señalización de insulina. Por ejemplo, se ha demostrado que la ALDO, a través del MR, disminuye los niveles proteicos del IRS-1

en células del músculo liso vascular [73]. Además, se ha reportado que la activación del MR por ALDO promueve eventos proinflamatorios, diferenciación de adipocitos, y altera la expresión de adipocinas, todas acciones que pueden influir en la homeostasis de la glucosa. En este contexto, también se ha evidenciado que niveles elevados de ALDO en suero están asociados con un mayor riesgo de desarrollar resistencia a la insulina, SMet y obesidad [74].

Por otro lado, cuando renina/prorenina circulantes se unen al PRR, no solo se desencadena la generación local de Ang II, sino que además se activa la cascada de señalización de las MAPKs (ERK1/2, p38, y JNK), que conllevan a la regulación positiva de citocinas proinflamatorias, como el factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). Es por lo anterior que se ha sugerido, que mediante estos mecanismos la renina/prorenina/PRR, de manera independiente de Ang II/AT<sub>1</sub>R, esté involucrada en el desarrollo de la resistencia a la insulina [75].

En contraparte, Ang 1-7/MasR promueve efectos positivos sobre la homeostasis de la glucosa, el metabolismo de los lípidos y el equilibrio energético [15, 60]. Además, cuando se utilizan ARBs se detecta un predominio de la señalización del eje ACE2/Ang 1-7/MasR, mediante el cual se preservan los islotes pancreáticos y se previene el desarrollo de DM2 [71, 76]. Las acciones de Ang 1-7/MasR se han estudiado tanto *in vivo* como *in vitro* para establecer su función en la secreción de la insulina y se ha reportado que la ausencia del MasR afecta la secreción de la insulina [77].

Estudios en ratones obesos han sugerido que el eje ACE2/Ang 1-7/MasR parece estar implicado en la disminución de la hipertrofia de los islotes pancreáticos y en el aumento de la vascularización, ya que estos efectos benéficos se presentan por el uso de fármacos que inhiben selectivamente la vía AT<sub>1</sub>R/Ang II, como el losartán [78, 79]. Por otra parte, se ha sugerido que el mal funcionamiento enzimático de la ACE2 también contribuye a la disfunción de los islotes, por el hecho de que la proliferación de las células  $\beta$  y su masa se encuentran disminuidas [80, 81].

## 5.3. RAAS e inflamación

La inflamación se define como la respuesta fisiológica del organismo a infecciones, lesiones tisulares, y otras agresiones, que se traducen como un aumento del flujo sanguíneo, dilatación capilar, infiltración de células inmunes y secreción de mediadores inflamatorios producidos localmente para reparar el tejido dañado [82].

Se ha reportado que la respuesta inflamatoria desempeña un papel fundamental en el desarrollo y progresión de distintas enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, la nefropatía, la cardiopatía y la aterosclerosis en las que, mediante el uso de ARBs y ACEIs, se demostró que Ang II/AT<sub>1</sub>R desempeña un papel substancial (Figura 3) [82, 83].

En cuanto a los mecanismos moleculares por los que Ang II/AT<sub>1</sub>R promueve inflamación, se ha descrito que mediante la activación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), la Ang II aumenta la expresión de diferentes citocinas inflamatorias como las IL-1 $\beta$ , IL-6, el TNF $\alpha$  y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) [84, 85]. Por otra parte, estudios en animales y humanos demos-

traron que el uso de antagonistas de los AT<sub>1</sub>R inhiben la activación y acumulación de los marcadores de inflamación [45, 86].

Además de las acciones proinflamatorias del eje Ang II/AT<sub>1</sub>R, se han descrito también efectos antiinflamatorios de RAAS, mediados principalmente por el eje ACE2/Ang 1-7/MasR [87, 88], y por Ang II/AT<sub>2</sub>R. Se ha demostrado que tanto Ang 1-7/MasR como Ang II/AT<sub>2</sub>R contribuyen a la síntesis de agentes antiinflamatorios, que entre otras funciones inhibe el crecimiento celular, promueve el aumento de la sensibilidad a la insulina y ejerce un efecto anti-trombótico que suprime la vía de NF-κB, lo que provoca una disminución de la producción de citocinas proinflamatorias [89, 90]. Por otro lado, recientemente se demostró que otro de los péptidos de RAAS, la alamandina, a través del MrgDR, también ejerce acciones antiinflamatorias al reducir la expresión de agentes proinflamatorios como TNF-α, IL-1β, IL-6 en macrófagos estimulados con LPS-IFN-γ [91]. Por su parte, la unión de Ang II al AT<sub>2</sub>R se ha visto asociada a respuestas antiinflamatorias a través de la formación de NO y la activación de fosfatasa. Aunque los niveles de expresión del AT<sub>2</sub>R se encuentran disminuidos en el organismo adulto, se ha detectado un aumento en su expresión bajo condiciones patológicas, por lo que Ang II/AT<sub>2</sub>R actualmente es considerado como un blanco terapéutico ante condiciones de SMet y obesidad, condiciones en las que se ha demostrado un estado de inflamación crónico de bajo grado [92, 93].

#### 5.4. RAAS en cáncer

Evidencia preclínica, clínica y experimental sugiere que la presencia y señalización de RAAS locales tiene una participación decisiva en el desarrollo, crecimiento y progresión de algunos tipos de cánceres, incluidos los de riñón, próstata, vejiga, estómago, útero, cerebro, páncreas, colon, pulmón, hígado, mama y piel [94-96]. Fue mediante la utilización de los ARBs y los ACEIs que se evidenció la participación de Ang II/AT<sub>1</sub>R, en el crecimiento, la vascularización e invasividad de los cánceres asociados a RAAS [95-98]. Además, se identificó que el AT<sub>1</sub>R se sobreexpresa tanto en líneas celulares tumorales como en cánceres humanos y que esta sobreexpresión se asocia con tumores de mayor tamaño y densidad vascular, que son características asociadas a la agresividad del cáncer (Figura 4) [95, 99, 100]. Además, los niveles de expresión del AT<sub>1</sub>R se correlacionan positivamente con la infiltración de macrófagos en el tejido tumoral, los niveles del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y la vascularización del tumor [101].

En cuanto a la señalización más comúnmente asociada a las acciones de desarrollo y progresión tumoral de Ang II/AT<sub>1</sub>R se ha mostrado que esta es mediante la activación de las vías de las MAPKs, PI3K/Akt/mTOR, NF-κB y JAK/STAT que aumentan la expresión del VEGF, TGF-β1, EGFR y fibronectina, vías que conducen a una mayor proliferación celular, angiogénesis, fibrosis, invasión tumoral y metástasis [96].

Otros componentes de RAAS como renina/prorenina/PRR y ALDO/MR también han sido reconocidos como promotores activos de distintos cánceres. En el caso de renina/prorenina/PRR, ésta activa las vías de las MAPKs/ERK1/2 y PI3K/Akt/mTOR para promover supervivencia y proliferación celular. Además,

mediante la generación del TGF-β, y la producción de ROS participan en la patogénesis y metástasis de varios tipos de cánceres, como el cáncer colorrectal, el cáncer pancreático, el glioma, el carcinoma de mama y el adenoma productor de ALDO [96, 102]. En cuanto a la ALDO, el único estudio que ha explorado la actividad de la ALDO en el cáncer, encontró que tanto el bloqueo farmacológico del MR como la inhibición de la síntesis de ALDO, con una dieta rica en sal, impidieron la diseminación metastásica pulmonar en ratones con adenocarcinoma de células renales, mientras que la administración de ALDO favoreció la metástasis tumoral [103].

Un contrapeso de las acciones que favorecen el crecimiento, y progresión de los cánceres asociados a Ang II/AT<sub>1</sub>R, lo constituyen Ang 1-7/MasR y Ang II/AT<sub>2</sub>R que han sido identificadas como contrarreguladoras de Ang II/AT<sub>1</sub>R [82, 96, 101]. En este sentido, Ang 1-7/MasR inhibe la fibrosis, reduce el peso y el volumen del tumor, así como impide la angiogénesis y la metástasis inducida por Ang II mediante la inhibición de la expresión de VEGF [96]. En cuanto a las acciones mediadas por el AT<sub>2</sub>R, se ha reportado que en la mayoría de los cánceres que expresan a estos receptores, la Ang II tiene efectos antiproliferativos, antianangiogénicos y favorece la apoptosis [99, 101].

#### 5.5. RAAS y COVID-19

RAAS resultó de gran relevancia en el contexto de la pandemia actual por coronavirus SARS-CoV-2, debido a que este virus aprovecha a la enzima ACE2 como receptor de ingreso a la célula, afectando las acciones del eje ACE2/Ang 1-7/MasR que contrarresta la vía clásica de RAAS, ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R (Figuras 4 y 5) [104]. Se sabe que la sobreestimulación de las vías dependientes de Ang II/AT<sub>1</sub>R provoca una respuesta inmune excesiva, inflamación, disfunción endotelial, aumento de la coagulación, trombosis y accidente cerebrovascular, además de contribuir al desarrollo de aterosclerosis y resistencia a la insulina en pacientes diabéticos [105]. Un aspecto importante de RAAS para el desarrollo de muchos de los síntomas de la infección del virus y del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) es que la expresión de la proteína ACE2 se encuentra en varios tejidos y órganos como la piel, la médula ósea, el hígado, el riñón, los ganglios linfáticos, las mucosas, los pulmones, los intestinos, tejido testicular y el cerebro, por lo que la infección afecta considerablemente a muchos de estos órganos (Figura 5) [106-109]. Tras la infección, la enzima ACE2 es internalizada y su expresión reducida, lo que da como resultado que el eje contrarregulador ACE2/Ang 1-7/MasR también se vea afectado, y predominen los efectos negativos del eje ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R sin que este pueda regularse negativamente. Los efectos de la disminución de la expresión de la ACE2 se han estudiado en roedores, observándose que esta reducción provoca daño pulmonar y síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) (Figuras 4 y 5) [107, 108, 110-112]. Además, el tejido pulmonar también se ve afectado de otras formas, al presentar una mayor permeabilidad vascular, la formación de edemas y la acumulación de neutrófilos [113, 114]. De igual forma se ha descrito que la ACE y los AT<sub>1</sub>R, que constituyen la vía clásica, promueven lesiones pulmonares [115, 116].

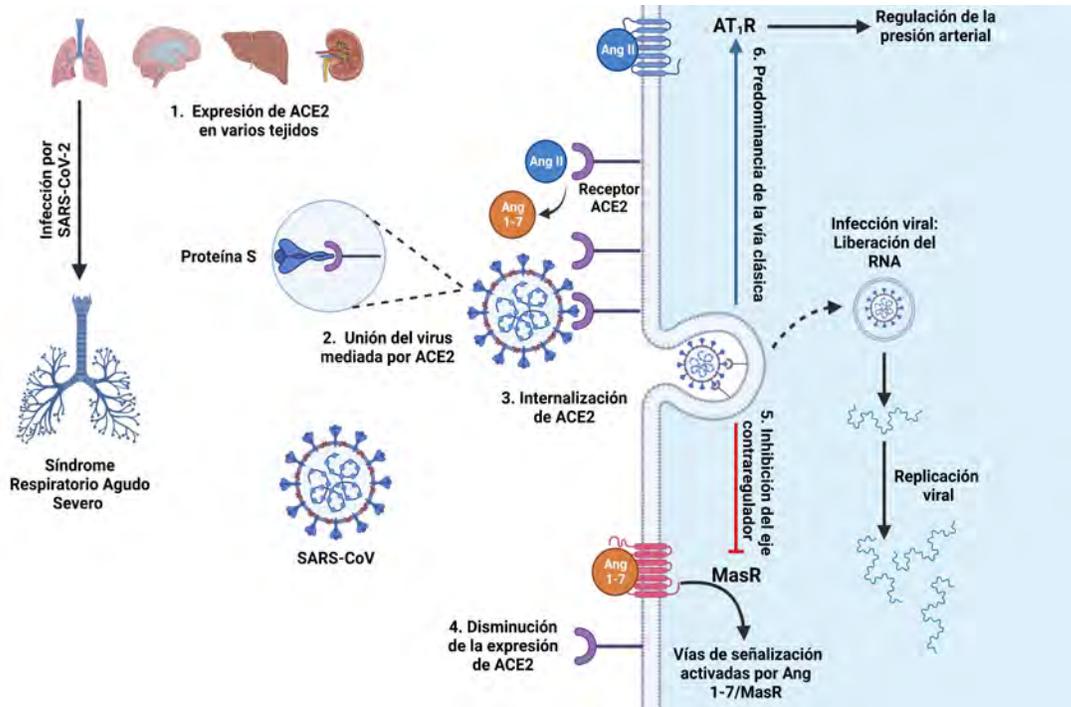


Figura 5. Infección viral por SARS-CoV-2 mediada por RAAS. El virus SARS-CoV-2 puede ingresar a la célula huésped a través de la enzima ACE2, provocando su internalización. Debido a que la expresión de ACE2 es amplia en diferentes órganos, su internalización afecta procesos cardiovasculares, funciones metabólicas y respiratorias. Después de la internalización de ACE2 su expresión se ve disminuida, lo que provoca una regulación al alza de la vía clásica de RAAS, Ang II/AT<sub>1</sub>R, y la inhibición de la vía contrarreguladora por Ang 1-7/MasR. ACE2, enzima convertidora de angiotensina tipo 2; Ang II, angiotensina II; Ang 1-7, angiotensina 1-7; AT<sub>1</sub>R, receptor de angiotensina tipo 1; MasR, receptor Mas. Imagen elaborada con BioRender.com.

Los pacientes que se encuentran en etapas más críticas de la enfermedad COVID-19, también presentan una reacción inmunitaria grave, en la que se liberan altos niveles de citocinas en la sangre (tormenta de citocinas); el exceso de citocinas provoca la muerte de las células epiteliales y endoteliales y la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias, que junto con una disminución de la ACE2 pulmonar, empeora el ARDS y conduce al fallo multiorgánico y en consecuencia la muerte de los pacientes [117, 118]. Con la infección por SARS-CoV-2, la activación del eje Ang II/AT<sub>1</sub>R afecta la señalización endotelial, en la que la respuesta inflamatoria se caracteriza por niveles elevados de proteína C reactiva (CRP) e IL-6 a través de mecanismos en el que los niveles de ROS se ven aumentadas, lo que promueve inflamación [119]. Además de la CRP e IL-6, la generación de ROS aumenta la producción del TNF- $\alpha$ , la MCP-1 y el NF- $\kappa$ B, entre otros factores inflamatorios que causan inflamación sistémica e hipercoagulabilidad [82, 120]. Cuando los pacientes entran a un estado de hipercoagulabilidad existe la formación de émbolos pulmonares y eventos de trombosis [114].

Es importante mencionar que debido a la relevancia que tiene RAAS en el sistema cardiovascular, los efectos a nivel pulmonar son solo algunos de los que se presentan en los pacientes con COVID-19. Los pacientes en estado crítico también presentan hipertensión, disfunción cardíaca y arritmias, efectos también asociados a la disminución de la proteína ACE2 en el tejido cardíaco

[121, 122]. Otro de los problemas que agravan el estado crítico de los pacientes con COVID-19 es la presencia de DM2 y obesidad, por un lado, porque la Ang II es producida en el tejido adiposo, por lo que el exceso de tejido adiposo en el estado de sobrepeso y obesidad agrava la infección, y por otro, porque los pacientes diabéticos con niveles insuficientes de insulina promueven una mayor actividad de Ang II en los tejidos metabólicos, ya que en condiciones normales la insulina puede regular negativamente los efectos inflamatorios que provoca Ang II [121, 123, 124].

En marzo del 2020, un trabajo de investigación publicado en *The Lancet* sugirió que pacientes con hipertensión arterial, enfermedad cardíaca o DM2 con prescripción de inhibidores de RAAS, ACEIs o ARBs, podrían presentar un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares graves por infección por SARS-CoV-2 [125, 126]. Esta hipótesis se basó en el hecho de que los inhibidores de RAAS pueden aumentar la expresión de los niveles de ACE2, lo que podría facilitar la entrada de SARS-CoV-2 a las células y, por lo tanto, conducir a un peor pronóstico.

## 6. Conclusiones

RAAS ha sido predominantemente estudiado por sus efectos sobre la regulación de la presión arterial y el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular y renal, efectos inicialmente atribui-

dos a la Ang II, considerada por mucho tiempo como el único péptido bioactivo de RAAS. Los efectos de Ang II a través de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> fueron bien establecidos, identificándose una clara participación de la activación del AT<sub>1</sub>R en las acciones clásicas cardiovasculares y renales de la Ang II, y una clara contraparte reguladora a través de Ang II/AT<sub>2</sub>R. Sin embargo, el concepto emergente de RAAS tisular o local, junto con la identificación de nuevos componentes bioactivos del sistema, así como de receptores distintos a los AT<sub>1</sub>R y AT<sub>2</sub>R, aumentó la relevancia fisiológica y clínica del sistema. De hecho, la evidencia de que RAAS se expresa en varios tejidos demostró que alteraciones en su expresión se encuentran involucradas en múltiples enfermedades, que incluyen enfermedades neurodegenerativas, metabólicas, cáncer, además de enfermedades a nivel cardiovascular y renal en las que el papel de Ang II/AT<sub>1</sub>R han sido identificados desde hace varias décadas. Finalmente, durante la pandemia de COVID-19, se identificó que el virus SARS-CoV-2 afecta directamente a RAAS en su vía clásica, ya que, al utilizar a la ACE2 como sitio blanco de invasión celular, se altera la estabilidad del sistema, debido a la disminución de la síntesis de Ang 1-7, principal producto de la actividad enzimática de ACE2. Lo anterior conlleva a un aumento en la actividad del eje Ang II/AT<sub>1</sub>R, provocando un desequilibrio sistémico de RAAS y aumentando el riesgo de complicaciones inflamatorias, cardiovasculares y metabólicas.

## 7. Agradecimientos

Los autores agradecen al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Cinvestav, por el apoyo recibido (JAO-R), al Conacyt por la beca otorgada a KDHG, CVU: 925174, y al doctor Rafael Villalobos Molina por las correcciones y comentarios para mejorar la redacción del presente capítulo.

## Referencias

- [1] Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, *et al.* Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2018; **98**(3):1627-1738.
- [2] Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT<sub>1</sub> receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol.* 2006; **20**(5):953-970.
- [3] Ramirez-Sanchez M, Prieto I, Wangensteen R, Banegas I, Segarra AB, Villarejo AB, *et al.* The Renin-Angiotensin System: New Insight into Old Therapies. *Current Medicinal Chemistry.* 2013; **20**(10):1313-1322.
- [4] Wu C-H, Mohammadmoradi S, Chen JZ, Sawada H, Daugherty A, Lu HS. Renin-Angiotensin System and Cardiovascular Functions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2018; **38**(7):e108-e116.
- [5] Ocaranza MP, Riquelme JA, García L, Jalil JE, Chiong M, Santos RAS, *et al.* Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology.* 2020; **17**(2):116-129.
- [6] Carey RM, Padia SH. Physiology and Regulation of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. In: Singh AK, Williams GH, editors. *Textbook of Nephro-Endocrinology: Elsevier*; 2018, p. 1-25.
- [7] Matavelli LC, Siragy HM. AT<sub>2</sub> Receptor Activities and Pathophysiological Implications. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 2015; **65**(3):226-232.
- [8] Nehme A, Zouein FA, Zayeri ZD, Zibara K. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *Journal of Cardiovascular Development and Disease.* 2019; **6**(2):1-17.
- [9] Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, *et al.* Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-converting Enzyme-related Carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry.* 2002; **277**(17):14838-14843.
- [10] Tamanna S, Lumbers ER, Morosin SK, Delforce SJ, Pringle KG. ACE2: a key modulator of the renin-angiotensin system and pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2021; **321**(6):R833-R843.
- [11] Velez JCQ, Ryan KJ, Harbeson CE, Bland AM, Budisavljevic MN, Arthur JM, *et al.* Angiotensin I Is Largely Converted to Angiotensin (1-7) and Angiotensin (2-10) by Isolated Rat Glomeruli. *Hypertension.* 2009; **53**(5):790-797.
- [12] Povlsen A, Grimm D, Wehland M, Infanger M, Krüger M. The Vasoactive Mas Receptor in Essential Hypertension. *Journal of Clinical Medicine.* 2020; **9**(267):1-12.
- [13] Mascolo A, Sessa M, Scavone C, De Angelis A, Vitale C, Berriño L, *et al.* New and old roles of the peripheral and brain renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS): Focus on cardiovascular and neurological diseases. *International Journal of Cardiology.* 2017; **227**:734-742.
- [14] Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, *et al.* The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev.* 2018; **98**(1):505-553.
- [15] Ferreira AJ, Santos RAS, Bradford CN, Mecca AP, Sumners C, Katovich MJ, *et al.* Therapeutic Implications of the Vasoprotective Axis of the Renin-Angiotensin System in Cardiovascular Diseases. *Hypertension.* 2010; **55**(2):207-213.
- [16] Norambuena-Soto I, Lopez-Crisosto C, Martinez-Bilbao J, Hernandez-Fuentes C, Parra V, Lavandero S, *et al.* Angiotensin-(1-9) in hypertension. *Biochemical Pharmacology.* 2022; **203**:1-13.
- [17] Jackson L, Eldahshan W, Fagan S, Ergul A. Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018; **19**(3):1-23.
- [18] Wright J, Kawas L, Harding J. A Role for the Brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Frontiers in Endocrinology.* 2013; **4**:1-12.
- [19] Balakumar P, Jagadeesh G. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT<sub>1</sub> receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cellular Signaling.* 2014; **26**(10):2147-2160.
- [20] Hrenak J, Paulis L, Simko F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences.* 2016; **17**(7):1-9.
- [21] Suzuki S, Iida M, Hiroaki Y, Tanaka K, Kawamoto A, Kato T, *et al.* Structural insight into the activation mechanism of MrgD

- with heterotrimeric Gi-protein revealed by cryo-EM. *Communications Biology*. 2022; **5**(707):1-13.
- [22] Hennrikus M, Gonzalez AA, Prieto MC. The prorenin receptor in the cardiovascular system and beyond. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2018; **314**(2):H139-H145.
- [23] Ichihara A, Yatabe MS. The (pro)renin receptor in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2019; **15**(11):693-712.
- [24] Ramkumar N, Kohan DE. The (pro)renin receptor: an emerging player in hypertension and metabolic syndrome. *Kidney International*. 2019; **95**(5):1041-1052.
- [25] Tyrankiewicz U, Kij A, Mohaissen T, Olkowicz M, Smolenski RT, Chlopicki S. Renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure: focus on nonclassical angiotensin pathways as novel upstream targets regulating aldosterone. Aldosterone-Mineralocorticoid Receptor-Cell Biology to Translational Medicine. 2019.
- [26] Funder J. Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors—Physiology and Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; **18**(5):1-9.
- [27] Cannavo A, Bencivenga L, Liccardo D, Elia A, Marzano F, Gambino G, et al. Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor System in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; **2018**:1-10.
- [28] Salazar-Enciso R, Camacho-Concha NA, Mesquita TR, Falcón D, Benitah J-P, Gómez AM, et al. Mineralocorticoid Receptor in Calcium Handling of Vascular Smooth Muscle Cells. *Calcium and Signal Transduction: InTech*; 2018.
- [29] Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006; **86**(3):747-803.
- [30] Ayoub MA. Angiotensin II type 1 receptor heterodimers in the kidney. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*. 2021; **16**:96-101.
- [31] Gomes I, Ayoub MA, Fujita W, Jaeger W, C., Pflieger K, D. G., Devi L, A. G Protein-Coupled Receptor Heteromers. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2016; **56**(1):403-425.
- [32] Rukavina Mikusic, L. N, Silva MG, Pineda AM, Gironacci MM. Angiotensin Receptors Heterodimerization and Trafficking: How Much Do They Influence Their Biological Function? *Frontiers in Pharmacology*. 2020; **11**:1-20.
- [33] Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, et al. G-Protein-Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Circulation*. 2005; **111**(14):1806-1813.
- [34] AbdAlla S, Lother H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. 2001; **7**(9):1003-1009.
- [35] Leonhardt J, Villela DC, Teichmann A, Münter L-M, Mayer MC, Mardahl M, et al. Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension*. 2017; **69**(6):1128-1135.
- [36] Patel S, Hussain T. Dimerization of AT2 and Mas Receptors in Control of Blood Pressure. *Current Hypertension Reports*. 2018; **20**(41):1-9.
- [37] Medina D, Mehay D, Arnold AC. Sex differences in cardiovascular actions of the renin-angiotensin system. *Clinical Autonomic Research*. 2020; **30**(5):393-408.
- [38] Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. Renin Release. *Physiology*. 2007; **22**(5):310-319.
- [39] Chappell MC, Marshall AC, Alzayadneh EM, Shaltout HA, Diz DI. Update on the Angiotensin converting enzyme 2-Angiotensin (1-7)-MAS receptor axis: fetal programming, sex differences, and intracellular pathways. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014; **4**(201):1-13.
- [40] Peters Jr, Farrenkopf R, Clausmeyer S, Zimmer J, Kantachuvesiri S, Sharp MGF, et al. Functional Significance of Prorenin Internalization in the Rat Heart. *Circulation Research*. 2002; **90**(10):1135-1141.
- [41] Cosarderelioglu C, Nidadavolu LS, George CJ, Oh ES, Bennett DA, Walston JD, et al. Brain Renin-Angiotensin System at the Intersect of Physical and Cognitive Frailty. *Frontiers in Neuroscience*. 2020; **14**:1-29.
- [42] Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2011; **301**(1):E11-E24.
- [43] Miller AJ, Arnold AC. The renin-angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. *Clinical Autonomic Research*. 2019; **29**(2):231-243.
- [44] Lastra-Lastra G, Sowers JR, Restrepo-Erazo K, Manrique-Acevedo C, Lastra-Gonzalez G. Role of aldosterone and angiotensin II in insulin resistance: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009; **71**(1):1-6.
- [45] Ferreira NS, Tostes RC, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone, Inflammation, Immune System, and Hypertension. *American Journal of Hypertension*. 2020; **34**(1):15-27.
- [46] Santos RA. Angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 2014; **63**(6):1138-1147.
- [47] Marzolla V, Armani A, Feraco A, De Martino MU, Fabbri A, Rosano G, et al. Mineralocorticoid receptor in adipocytes and macrophages: A promising target to fight metabolic syndrome. *Steroids*. 2014; **91**:46-53.
- [48] Simoes-e-Silva AC, Baracho NC, Passaglio KT, Santos RA. Renal actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. 1997; **30**(4):503-513.
- [49] Fountain JH, Lappin SL. Physiology, Renin Angiotensin System: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2021.
- [50] Pinheiro SVB, Ferreira AJ, Kitten GT, Da Silveira KD, Da Silva DA, Santos SHS, et al. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney International*. 2009; **75**(11):1184-1193.
- [51] Seva Pessoa B, van der Lubbe N, Verdonk K, Roks AJ, Hoorn EJ, Danser AH. Key developments in renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Nat Rev Nephrol*. 2013; **9**(1):26-36.
- [52] Choi MR, Cavallero CS, Fernandez BE. The renin angiotensin system in the central nervous system. *Physiological Mini-Reviews*. 2011; **5**(5):18-31.
- [53] Takahashi K, Hiraishi K, Hirose T, Kato I, Yamamoto H, Shoji I, et al. Expression of (Pro)renin Receptor in the Human Brain and Pituitary, and Co-localisation with Arginine Vasopressin and Oxytocin in the Hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*. 2010; **22**(5):453-459.
- [54] Saavedra JM. Brain and Pituitary Angiotensin. *Endocrine Reviews*. 1992; **13**(2):329-380.

- [55] Von Bohlen Und Halbach O, Albrecht D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell and Tissue Research*. 2006; **326**(2):599-616.
- [56] Abiodun OA, Ola MS. Role of brain renin angiotensin system in neurodegeneration: An update. *Saudi J Biol Sci*. 2020; **27**(3):905-912.
- [57] Farag E, Sessler DI, Ebrahim Z, Kurz A, Morgan J, Ahuja S, *et al*. The renin angiotensin system and the brain: New developments. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2017; **46**:1-8.
- [58] Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D. Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2005; **29**(3):427-435.
- [59] Yang R-F, Yin J-X, Li Y-L, Zimmerman MC, Schultz HD. Angiotensin-(1-7) increases neuronal potassium current via a nitric oxide-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2011; **300**(1):C58-C64.
- [60] Lazaroni TLN, Raslan ACS, Fontes WRP, de Oliveira ML, Bader M, Alenina N, *et al*. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2012; **97**(1):113-123.
- [61] Favre G, A., Esnault V, L. M., Van Obberghen E. Modulation of glucose metabolism by the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2015; **308**(6):E435-E449.
- [62] White MC, Fleeman R, Arnold AC. Sex differences in the metabolic effects of the renin-angiotensin system. *Biology of Sex Differences*. 2019; **10**(31):1-18.
- [63] Luther JM, Brown NJ. The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2011; **32**(12):734-739.
- [64] Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo-Hernandez JR. Angiotensin II and the development of insulin resistance: Implications for diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; **302**(2):128-139.
- [65] Gutierrez-Rodelo C, Arellano-Plancarte A, Hernandez-Aranda J, Landa-Galvan HV, Parra-Mercado GK, Moreno-Licon NJ, *et al*. Angiotensin II Inhibits Insulin Receptor Signaling in Adipose Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; **23**(11):1-22.
- [66] Gutierrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. Molecular mechanisms of insulin resistance: an update. *Gac. Med. Mex*. 2017; **153**(2):197-209.
- [67] Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C, *et al*. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; **293**(4):H2009-H2023.
- [68] Arellano-Plancarte A, Hernandez-Aranda J, Catt KJ, Olivares-Reyes JA. Angiotensin-induced EGF receptor transactivation inhibits insulin signaling in C9 hepatic cells. *Biochem. Pharmacol*. 2010; **79**(5):733-745.
- [69] Hsueh WA, Wyne K. Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Diabetes and Hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension*. 2011; **13**(4):224-237.
- [70] Bargagli E, Refini RM, D'Alessandro M, Bergantini L, Cameli P, Vantaggiato L, *et al*. Metabolic Dysregulation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; **21**(16):1-17.
- [71] Graus-Nunes F, Souza-Mello V. The renin-angiotensin system as a target to solve the riddle of endocrine pancreas homeostasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; **109**:639-645.
- [72] Kikumoto Y, Sugiyama H, Inoue T, Morinaga H, Takiue K, Kitagawa M, *et al*. Sensitization to alloxan-induced diabetes and pancreatic cell apoptosis in acatalasemic mice. *Biochim Biophys Acta*. 2010; **1802**(2):240-246.
- [73] Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A, Hara T, Moriwaki K, Kaifu K, *et al*. Aldosterone suppresses insulin signaling via the downregulation of insulin receptor substrate-1 in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2007; **50**(4):750-755.
- [74] Briet M, Schiffrin EL. The Role of Aldosterone in the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*. 2011; **13**(2):163-172.
- [75] Rafiq K, Mori H, Masaki T, Nishiyama A. Prorenin receptor and insulin resistance: possible roles of angiotensin II-dependent and -independent pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2013; **378**(1-2):41-45.
- [76] Frantz ED, Crespo-Mascarenhas C, Barreto-Vianna AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Renin-angiotensin system blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *PLoS One*. 2013; **8**(7):e67192.
- [77] Sahr A, Wolke C, Maczewsky J, Krippeit-Drews P, Tetzner A, Drews G, *et al*. The Angiotensin-(1-7)/Mas Axis Improves Pancreatic  $\beta$ -Cell Function in Vitro and in Vivo. *Endocrinology*. 2016; **157**(12):4677-4690.
- [78] Simões E Silva AC, Lanza K, Palmeira VA, Costa LB, Flynn JT. 2020 update on the renin-angiotensin-aldosterone system in pediatric kidney disease and its interactions with coronavirus. *Pediatric Nephrology*. 2021; **36**(6):1407-1426.
- [79] Mascolo A, Scavone C, Rafaniello C, De Angelis A, Urbanek K, di Mauro G, *et al*. The Role of Renin-Angiotensin-Aldosterone System in the Heart and Lung: Focus on COVID-19. *Front Pharmacol*. 2021; **12**:1-14.
- [80] Shoemaker R, Yiannikouris F, Thatcher S, Cassis L. ACE2 deficiency reduces  $\beta$ -cell mass and impairs  $\beta$ -cell proliferation in obese C57BL/6 mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2015; **309**(7):E621-E631.
- [81] Fignani D, Licata G, Brusco N, Nigi L, Grieco GE, Marselli L, *et al*. SARS-CoV-2 Receptor Angiotensin I-Converting Enzyme Type 2 (ACE2) Is Expressed in Human Pancreatic  $\beta$ -Cells and in the Human Pancreas Microvasculature. *Frontiers in Endocrinology*. 2020; **11**:1-19.
- [82] Ekholm M, Kahan T. The Impact of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System on Inflammation, Coagulation, and Atherothrombotic Complications, and to Aggravated COVID-19. *Frontiers in Pharmacology*. 2021; **12**:1-20.
- [83] Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflamm*. 2014; **2014**:1-13.
- [84] Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, *et al*. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biology*. 2019; **20**:247-260.
- [85] Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; **20**(6008):1-31.

- [86] Crowley SD, Rudemiller NP. Immunologic Effects of the Renin-Angiotensin System. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017; **28**(5):1350-1361.
- [87] Alexandre J, Cracowski J-L, Richard V, Bouhanick B. Renin-angiotensin-aldosterone system and COVID-19 infection. *Annales d'Endocrinologie*. 2020; **81**(2):63-67.
- [88] Zhang Y-Y, Yu Y, Yu C. Antifibrotic Roles of RAAS Blockers: Update. *Advances in Experimental Medicine and Biology: Springer Singapore*; 2019, pp. 671-691.
- [89] Hoevenaer M, Goossens D, Roorda J. Angiotensin-converting enzyme 2, the complement system, the kallikrein-kinin system, type-2 diabetes, interleukin-6, and their interactions regarding the complex COVID-19 pathophysiological crossroads. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2020; **21** (4): 1-21.
- [90] Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. 2017; **11**(8):215-225.
- [91] de Carvalho Santuchi M, Dutra MF, Vago JP, Lima KM, Galvão I, de Souza-Neto FP, et al. Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages In Vitro and In Vivo. *Mediators of Inflammation*. 2019; **2019**:1-14.
- [92] Patel SN, Fatima N, Ali R, Hussain T. Emerging Role of Angiotensin AT2 Receptor in Anti-Inflammation: An Update. *Current Pharmaceutical Design*. 2020; **26**(4):492-500.
- [93] Paulis L, Foulquier S, Namsolleck P, Recarti C, Steckelings UM, Unger T. Combined Angiotensin Receptor Modulation in the Management of Cardio-Metabolic Disorders. *Drugs*. 2016; **76**(1):1-12.
- [94] Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2005; **16**(7):293-299.
- [95] Almutlaq M, Alamro AA, Alamri HS, Alghamdi AA, Barhoumi T. The Effect of Local Renin Angiotensin System in the Common Types of Cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 2021; **12**:1-18.
- [96] Afsar B, Afsar RE, Ertuglu LA, Kuwabara M, Ortiz A, Covic A, et al. Renin-angiotensin system and cancer: epidemiology, cell signaling, genetics and epigenetics. *Clin Transl Oncol*. 2021; **23**(4):682-696.
- [97] George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nature Reviews Cancer*. 2010; **10**(11):745-759.
- [98] Bertero E, Canepa M, Maack C, Ameri P. Linking Heart Failure to Cancer. *Circulation*. 2018; **138**(7):735-742.
- [99] Garcia-Garduno TC, Padilla-Gutierrez JR, Cambron-Mora D, Valle Y. RAAS: A Convergent Player in Ischemic Heart Failure and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021; **22**:1-18.
- [100] Liu Y, An S, Ward R, Yang Y, Guo X-X, Li W, et al. G protein-coupled receptors as promising cancer targets. *Cancer Letters*. 2016; **376**(2):226-239.
- [101] Pinter M, Jain RK. Targeting the renin-angiotensin system to improve cancer treatment: Implications for immunotherapy. *Science Translational Medicine*. 2017; **9**(410):1-11.
- [102] Wang J, Nishiyama A, Matsuyama M, Wang Z, Yuan Y. The (pro)renin receptor: a novel biomarker and potential therapeutic target for various cancers. *Cell Communication and Signaling*. 2020; **18**(39):1-13.
- [103] Feldman RD, Ding Q, Hussain Y, Limbird LE, Pickering JG, Gros R. Aldosterone mediates metastatic spread of renal cancer via the G protein-coupled estrogen receptor (GPER). *The FASEB Journal*. 2016; **30**(6):2086-2096.
- [104] Williams PB. Renin Angiotensin System Inhibition as treatment for Covid-19? *EclinicalMedicine*. 2021; **37**(101023):1-2.
- [105] Wiese OJ, Allwood BW, Zemlin AE. COVID-19 and the renin-angiotensin system (RAS): A spark that sets the forest alight? *Medical Hypotheses*. 2020; **144**(110231):1-4.
- [106] Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004; **203**(2):631-637.
- [107] Cheng H, Wang Y, Wang G-Q. Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *Journal of Medical Virology*. 2020; **92**(7):726-730.
- [108] Bian J, Li Z. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2): SARS-CoV-2 receptor and RAS modulator. *Acta Pharm Sin B*. 2021; **11**(1):1-12.
- [109] Edenfield RC, Easley CA. Implications of testicular ACE2 and the renin-angiotensin system for SARS-CoV-2 on testis function. *Nature Reviews Urology*. 2022; **19**(2):116-127.
- [110] Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*. 2005; **436**(7047):112-116.
- [111] Khan A, Benthin C, Zeno B, Albertson TE, Boyd J, Christie JD, et al. A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Critical Care*. 2017; **21**(234):1-9.
- [112] Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020; **8**(4):420-422.
- [113] Jin Y, Ji W, Yang H, Chen S, Zhang W, Duan G. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020; **5**(293):1-13.
- [114] Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong J-C, Turner AJ, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System. *Circulation Research*. 2020; **126**(10):1456-1474.
- [115] Gao Y-L, Du Y, Zhang C, Cheng C, Yang H-Y, Jin Y-F, et al. Role of Renin-Angiotensin System in Acute Lung Injury Caused by Viral Infection. *Infection and Drug Resistance*. 2020; **13**:3715-3725.
- [116] Mancini GB, Khalil N. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits pulmonary injury. *Clin Invest Med*. 2005; **28**(3):118-126.
- [117] Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Frontiers in Immunology*. 2020; **11**(1446):1-4.
- [118] Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Muhammad J, Khan A, Sule AA, Tirupathi R, et al. Role of Inflammatory Cytokines in COVID-19 Patients: A Review on Molecular Mechanisms, Immune Functions,

- Immunopathology and Immunomodulatory Drugs to Counter Cytokine Storm. *Vaccines*. 2021; **9**(436):1-23.
- [119] Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, Lipworth BJ, Hellmuth JC, Von Bergwelt-Baildon M, *et al*. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020; **146**(1):128-136.e124.
- [120] Tanase DM, Gosav EM, Radu S, Ouatu A, Rezus C, Ciocoiu M, *et al*. Arterial Hypertension and Interleukins: Potential Therapeutic Target or Future Diagnostic Marker? *International Journal of Hypertension*. 2019; **2019**:1-17.
- [121] Nishiga M, Wang DW, Han Y, Lewis DB, Wu JC. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*. 2020; **17**(9):543-558.
- [122] Augustine R, S A, Nayeem A, Salam SA, Augustine P, Dan P, *et al*. Increased complications of COVID-19 in people with cardiovascular disease: Role of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) dysregulation. *Chemico-Biological Interactions*. 2022; **351**:1-13.
- [123] Cordeiro A, Ribamar A, Ramalho A. Adipose tissue dysfunction and MAFLD in obesity on the scene of COVID-19. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2022; **46**(3):1-9.
- [124] Aksoy H, Karadag AS, Wollina U. Angiotensin II receptors: Impact for COVID-19 severity. *Dermatologic Therapy*. 2020; **33**(6):1-6.
- [125] Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes *mellitus* at increased risk for COVID-19 infection? *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020; **8**(4):e21.
- [126] Ferrari F, Martins VM, Fuchs FD, Stein R. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in COVID-19: A Review. *Clinics (Sao Paulo)*. 2021; **76**(e2342):1-14.

### KARLA DANIELA HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ

Licenciada en Biología por la Universidad Veracruzana, y Maestra en Ciencias en la Especialidad de Bioquímica por el Departamento de Bioquímica del Cinvestav. Actualmente realiza sus estudios de Doctorado en la Especialidad de Bioquímica, en el Laboratorio de Transducción de Señales del Departamento de Bioquímica del Cinvestav, bajo la tutoría del doctor Jesús Alberto Olivares Reyes y es becaria Conacyt (No.925174). Ha participado en los Congresos Nacionales de la Sociedad Mexicana de Bioquímica (SMB), de la Rama de Transducción de Señales de la SMB, y de la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales, e Internacionales de la Sociedad Italo-Latinoamericana de Etnomedicina, y en cursos y seminarios de la Sociedad Mexicana de Resonancia Magnética Nuclear y del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

### JESÚS ALBERTO OLIVARES REYES

Biólogo por la Facultad de Ciencias de la UNAM (1992). Obtuvo los grados de Maestría (1994) y Doctorado (1997) (Ciencias Químicas, Bioquímica) por la Facultad de Química de la UNAM. El doctor Olivares realizó una estancia posdoctoral en el *Endocrinology and Reproduction Research Branch, del National Institutes of Child Health and Human Development* del NIH, en Bethesda, MD, EUA (1997-2001). Al término de la estancia se incorporó como investigador titular del Departamento de Bioquímica del Cinvestav (2002--), como Jefe del Laboratorio de Transducción de Señales. Fue Coordinador Académico de los programas de posgrado del Departamento de Bioquímica del 2005 al 2013 y Jefe del Departamento del 2013 al 2021. Es Socio Numerario de la SMB desde el año 2004 y miembro del SNI, nivel II. Es autor de 35 artículos originales en revistas de prestigio internacional con arbitraje estricto, 5 artículos de revisión publicados en revistas internacionales con arbitraje, 5 publicaciones nacionales arbitradas, 2 capítulos de libros y 98 resúmenes de congresos nacionales e internacionales. Ha graduado un total de 38 estudiantes: 9 de Licenciatura, 22 de Maestría (2 en cotutoría) y 7 de Doctorado (2 en cotutoría). Ha recibido varios financiamientos del Conacyt y de UC-MEXUS-Conacyt. Ha participado en diversos comités de evaluación de proyectos,

incluyendo a la Universidad Nacional Autónoma de México, de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, de la Universidad Autónoma de Querétaro, de la Benemérita Universidad de Puebla; del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONACYT) de la Argentina y del Conacyt. Es Review Editor en *Frontiers in Vascular Physiology*, además de participar como peer reviewer de journals como *Biochemical Pharmacology*, *Molecular Endocrinology*, *Endocrinology*, *Plos One*, *Frontiers in Physiology*, *Cells*, *Open Biology*, entre otras, y como miembro del Comité de Moléculas Nuevas de la COFEPRIS. Fue distinguido con la Medalla Alfonso Caso al Mérito Universitario, otorgada por la Universidad Nacional Autónoma de México por los estudios de doctorado en noviembre de 1998, y en dos ocasiones por el Programa de Salud de la Fundación Miguel Alemán A. C. Para la SMB participó como miembro del comité organizador del VI Congreso de la Rama de Transducción de Señales, celebrado del 22 al 26 de octubre de 2017 en Puerto Vallarta, Jalisco, y como miembro del comité organizador del “VIII Congreso de la Rama de Transducción de Señales”, celebrado del 21 al 24 de noviembre de 2021, en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Evento Virtual.





# Obesidad y Síndrome Metabólico



# Síndrome metabólico: en la búsqueda de un biomarcador

Guadalupe Elena Donjuán Loredo y Ricardo Espinosa Tanguma  
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

**Resumen:** La obesidad central se define como la acumulación excesiva de grasa a nivel abdominal ocasionado por un desequilibrio en el balance energético. La obesidad central está relacionada con un mayor riesgo de padecer enfermedades inflamatorias, metabólicas y cardiovasculares. El conjunto de manifestaciones patológicas asociadas a la obesidad central se define como síndrome metabólico.

Los lípidos como moléculas biológicas participan en procesos básicos que son cruciales para el buen funcionamiento celular y tienen presencia en la patogenia de numerosas alteraciones metabólicas.

Las células que llevan a cabo un metabolismo muy activo de los lípidos contienen en su interior proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) que coordinan el transporte intracelular de sus ligandos hidrofóbicos hacia los diferentes compartimentos de la célula. Tienen patrones de expresión tisular característicos, por ejemplo, la FABP4 (A-FABP, aP2) se expresa principalmente en adipocitos y macrófagos, y bajo circunstancias patológicas asociadas a un tejido adiposo disfuncional son liberadas hacia la circulación sanguínea asociándose a la presencia de síndrome metabólico. Por ello, la FABP4 se ha considerado como un potencial biomarcador de enfermedades metabólicas y CV.

## Abreviaturas

ABCA1	Proteína transportadora de casete unida a ATP-A1
AC	Adenilil ciclasa
AHA	Asociación Americana del Corazón
AP1	Proteína activadora 1
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CV	Cardiovascular
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
ECV	Enfermedad cardiovascular
FABPs	Proteínas de unión a ácidos grasos
GC	Guanilil ciclasa
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HDL-c	Lipoproteína de alta densidad
HTA	Hipertensión arterial
IAM	Infarto agudo al miocardio
IKK	Complejo de cinasas Ikb
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
kDa	Kilodaltons
LDL-c	Lipoproteína de baja densidad
LXR $\alpha$	Receptor X hepático alfa
mmHg	Milímetros de mercurio
NF-Kb	Factor nuclear kappa B
OGTT	Curva de tolerancia a la glucosa oral
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Proteína C reactiva
PKA	Proteína cinasa A
PKG	Proteína cinasa G
PPAR $\gamma$	Receptor del factor proliferador de peroxisomas tipo gamma
RNA	Ácido ribonucleico
SM	Síndrome metabólico
TFG	Tasa de filtración glomerular
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VLDL-c	Lipoproteína de muy baja densidad

## 1. Introducción

El síndrome metabólico (SM) se caracteriza por la presencia de un conjunto de desórdenes metabólicos que incluyen obesidad abdominal o central, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, niveles bajos de colesterol de alta densidad (HDL-c) e hipertensión arterial (HTA), cuya presencia aumentan el riesgo para desarrollar diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) y enfermedad cardiovascular (ECV) [1]. De todas estas alteraciones la obesidad se ha identificado como el principal factor de riesgo para SM. Se calcula que a nivel mundial la prevalencia del SM varía del 20% al 45%; y se espera que alcance el 53% para el 2035 [2]. Sorprendentemente, la edad de diagnóstico de SM se ha ido disminuyendo progresivamente a lo largo de los últimos años. Hace más de 25 años, el mayor riesgo lo presentaban personas mayores de 50 años, pero en la actualidad los grupos de riesgo están en personas de 30 a 35 años.

## 2. Descripción de algunos componentes asociados al síndrome metabólico

### 2.1. Diabetes *mellitus* tipo 2

La DMT2 es una enfermedad crónica caracterizada por hiperglucemia asociada a resistencia a la acción de la insulina o a deficiencia en su producción. La DMT2 se asocia a múltiples complicaciones que afectan órganos como el corazón, vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios [3]. Aproximadamente 422 millones de personas en todo el mundo padecen DMT2 y aproximadamente 1.6 millones de muertes cada año están relacionadas directamente a la DMT2 y sus complicaciones [4].

La DMT2 y sus complicaciones se pueden prevenir por lo que el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno juegan un papel crucial. Las pruebas bioquímicas de rutina para el análisis de la glucemia son: glucosa sérica en ayunas, curva de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) y hemoglobina glucosilada (HbA1c) [5].

Además, se cuenta con un método ampliamente utilizado por los pacientes para el monitoreo ambulatorio en casa: la glucemia capilar medida a través de un glucómetro.

## 2.2. Hipertensión arterial

Según los criterios de la Asociación Americana del Corazón (AHA), la HTA se diagnostica cuando las cifras de presión arterial son  $\geq 130$  y/o  $\geq 80$  mmHg [6,7].

Tabla 1. Criterios de la AHA para el diagnóstico de HTA.

Estadio	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Presión arterial normal	<120	<80
Presión arterial elevada	120 - 129	$\leq 80$
Hipertensión estadio 1	130 - 139	80 - 89
Hipertensión estadio 2	$\geq 140$	$\geq 90$

Con estos nuevos criterios establecidos para su diagnóstico (Tabla 1), la prevalencia de HTA solo en los Estados Unidos se incrementó de manera súbita a 103 millones, es decir, alrededor del 46% de los adultos de ese país. La HTA crónica no controlada se asocia a daño cardiovascular y cerebrovascular, así como a daño renal, de allí que el diagnóstico y los tratamientos oportunos son muy importantes [7].

Hasta el momento en la práctica clínica, la forma de diagnóstico es mediante un esfigmomanómetro. Sin embargo, es necesario desarrollar nuevas herramientas o detectar biomarcadores que estén presentes en estados iniciales de esta patología. Por ejemplo, en la HTA se presenta disfunción en el endotelio vascular con un perfil bioquímico diferente al endotelio sano, de manera que la detección de ese cambio bioquímico podría ayudar a hacer el diagnóstico temprano de la enfermedad, incluso antes de que las cifras de tensión arterial se eleven. De igual manera podría hacerse con el tejido adiposo perivascular que presenta un perfil secretor específico en HTA asociada a obesidad [8]. Asimismo, también se podrían estudiar a las plaquetas de pacientes con HTA ya que muestran un comportamiento anormal en la liberación de proteínas, lípidos y receptores de su membrana celular lo que puede conducir a la formación de trombos y, en consecuencia, a un accidente cerebrovascular [9].

A nivel bioquímico también se observa aumento de las concentraciones de renina, enzima secretada por las células yuxtaglomerulares del riñón en respuesta a hipovolemia e hipotensión, y que cataliza el paso de angiotensinógeno a angiotensina I; este incremento de renina se ha considerado como un posible biomarcador relacionado con los estadios de la HTA y para el monitoreo de la respuesta al tratamiento ya que muchos de los antihipertensivos utilizados están dirigidos a algún punto de regulación del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona [10].

## 2.3. Dislipidemia

Las lipoproteínas son moléculas esféricas, hidrosolubles y complejas formadas por una capa externa formada de apoproteínas y un núcleo cargado de lípidos (colesterol y triglicéridos), que son transportados por todo el organismo a través de la sangre, estas lipoproteínas se clasifican según su densidad en varios tipos, algunas son: lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) o colesterol “bueno” con importante función cardioprotectora y las lipoproteínas de baja densidad o muy baja densidad (LDL, VLDL por sus siglas en inglés) o colesterol “malo” con implicaciones en el desarrollo de ECV.

La hipertrigliceridemia, los niveles bajos de la lipoproteína HDL-c, y los niveles elevados de las lipoproteínas LDL-c y VLDL-c son las principales alteraciones del metabolismo de los lípidos que se observan en el SM y es bien conocido que su presencia aumenta la morbilidad y la mortalidad cardiovascular [1, 11].

El consumo de alimentos que contienen calorías en exceso predispone al almacenamiento de triglicéridos dentro de los adipocitos. Existen múltiples factores que determinan la capacidad de este almacenamiento y cuando se sobrepasa este límite se inicia el depósito de lípidos ectópicos en órganos y tejidos como músculo esquelético, hígado, corazón y páncreas, que pueden interferir con su función causando lipotoxicidad [11].

Se sabe que la dislipidemia se asocia al SM a través de mecanismos en los cuales hay un aumento de la producción de adipocinas [factor de crecimiento de acción parecida a la insulina del tipo 1, angiotensinógeno, factor de necrosis tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ], interleucina 6 [IL-6], resistina, leptina y adiponectina]; proteínas secretadas principalmente por el tejido adiposo que se sabe es un tejido que almacena lípidos en forma de triglicéridos pero también tiene funciones endocrinas, las adipocinas secretadas juegan un papel muy importante en la homeostasis de varios procesos fisiológicos y metabólicos, dentro de las funciones en las que participan están: la regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa, en la remodelación vascular, la regulación de la presión arterial y la coagulación [12].

En la actualidad los niveles séricos de lípidos se obtienen con análisis bioquímicos utilizando reactivos específicos para la detección de cada uno de estos en sangre venosa. Se han utilizado biomarcadores inflamatorios para la detección precoz de patologías asociadas a la dislipidemia como aterosclerosis, infarto agudo al miocardio, entre otras.

## 2.4. Obesidad central

El principal factor de riesgo para padecer SM es la obesidad. En particular la acumulación de grasa visceral u obesidad central es la que se ha relacionado estrechamente a una amplia gama de alteraciones metabólicas. La acumulación excesiva de tejido adiposo en el abdomen y el tronco es favorecida por una ingesta elevada de calorías y una disminución de la actividad física. La obesidad central está considerada como un problema de salud a nivel mundial ya que en los últimos años ha alcanzado proporciones epidémicas [1]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el marco del Día Mundial de la Obesidad 2022 indicó la presencia

de más de 800 millones de adultos mayores de 18 años con obesidad [4].

Los adipocitos de personas con obesidad central están hipertrofiados debido a la acumulación excesiva de lípidos en su interior, lo que produce disfunción de estas células alterando por un lado la adipogénesis y la lipólisis que resulta en aumento de ácidos grasos libres permitiendo la acumulación de lípidos ectópicos y causando lipotoxicidad [2]. Además, esta disfunción del adipocito favorece una mayor liberación de adipocinas, razón por la cual el tejido adiposo es considerado como un importante órgano endocrino, además de las adipocinas ya mencionadas recientemente se han incluido nuevas moléculas dando lugar a efectos muy diversos y con importantes implicaciones en el desarrollo del SM [13].

La obesidad provoca estrés metabólico y respuestas inflamatorias en el tejido adiposo, las cuales son importantes mediadores de las patologías metabólicas y cardiovasculares relacionadas con la obesidad. Analizar y determinar las diversas alteraciones que se observan en el tejido adiposo en obesidad y el SM es complicado, ya que se requieren de pruebas moleculares y de imagen muy específicas que se realizan en los laboratorios de investigación, ya sea a través de la toma de biopsias, cultivos celulares o suero, incluso suelen ser costosas y deben ser realizadas por personal entrenado.

### 3. Detección temprana del síndrome metabólico

Realizar el diagnóstico temprano del SM permite: una intervención terapéutica anticipada, monitorear la respuesta al tratamiento, reducir la morbilidad y mortalidad, además de establecer un pronóstico de las enfermedades asociadas a este conjunto de alteraciones [14]. La mayoría de los estudios bioquímicos de rutina actuales (glucosa sérica en ayuno, curva de tolerancia a la glucosa oral, perfil de lípidos) para detectar alguno de los trastornos asociados al SM se basan en medir marcadores específicos para obtener resultados y establecer la alteración, o en pruebas antropométricas como el índice de masa corporal (IMC) o la toma de la presión arterial, y esto facilita el diagnóstico de enfermedades pero dificulta la detección de patologías que conforman un espectro muy amplio de alteraciones simultáneas como es el caso del SM. Lo ideal es contar con un biomarcador que ayude a detectar este espectro de alteraciones en una sola molécula proveniente de algunos de los tejidos que intervienen de forma patológica en el desarrollo del SM.

El tejido adiposo es una alternativa muy interesante ya que presenta inflamación crónica de bajo grado y otras anomalías metabólicas relacionadas con la patogénesis del SM. En ocasiones estas alteraciones fisiopatológicas a nivel local se presentan a pesar del IMC normal; por lo tanto, es crucial encontrar una molécula que indique la disfunción de este tejido y que permita identificar población de riesgo específica para la presencia del SM [15].

### 4. Proteínas de unión a ácidos grasos

Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs por sus siglas en inglés de Fatty Acid Binding Proteins), son una familia de proteínas citosólicas de 14-15 kDa cuya función fisiológica establecida es transportar y unirse reversiblemente con gran afinidad a ligandos hidrófobos como ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga, eicosanoides y otros lípidos [16]. Las FABPs son nombradas chaperonas lipídicas ya que facilitan su transporte a regiones específicas dentro de las células, ya sea trasladando los lípidos a vesículas de almacenamiento, al retículo endoplásmico para iniciar vías de señalización, para usarse en síntesis de membranas, dirigirlos hacia la mitocondria para la beta oxidación, regular actividad de enzimas citosólicas o hacia el núcleo para regular la transcripción mediada por lípidos (Figura 1) [17].

Las FABPs se encuentran en todas las especies, demostrando una fuerte conservación evolutiva. Se identificaron por primera vez en 1972 y hasta la fecha se han descrito al menos nueve isoformas en mamíferos (Tabla 2), que se expresan de forma única en cada tejido y del cual reciben su nombre en particular, en cada órgano su función fisiológica es la misma: ser una facilitadora del transporte intracelular de lípidos, pero la expresión de cada una dependerá del tipo de tejido y de su actividad en el metabolismo de ácidos grasos [18].

Tabla 2. Nombre de las diferentes isoformas de FABPs y el tejido donde se expresan.

Tejido	Nombre
Hígado	L-FABP, FABP1
Intestino	I-FABP, FABP2
Corazón	H-FABP, FABP3
Adiposo	A-FABP, FABP4, aP2
Epidermis	E-FABP, FABP5, mal1
Íleon	II-FABP, FABP6
Cerebro	B-FABP, FABP7
Mielina	M-FABP, FABP8
Testículo	T-FABP, FABP9

Entre cada uno de los miembros de la familia de las FABPs hay una similitud del 15-70% entre las secuencias de aminoácidos y su estructura tridimensional es semejante, la cual consiste en: dos hojas  $\beta$ -ortogonales de cinco hebras y una estructura de barril  $\beta$ -antiparalela de 10 hebras. El sitio de unión para el ácido graso se encuentra dentro del barril  $\beta$  [16, 18].

### 5. La proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4) en el desarrollo del síndrome metabólico

Una de las moléculas más activas de esta familia es la FABP4 también llamada aP2 o A-FABP, que se expresa principalmente

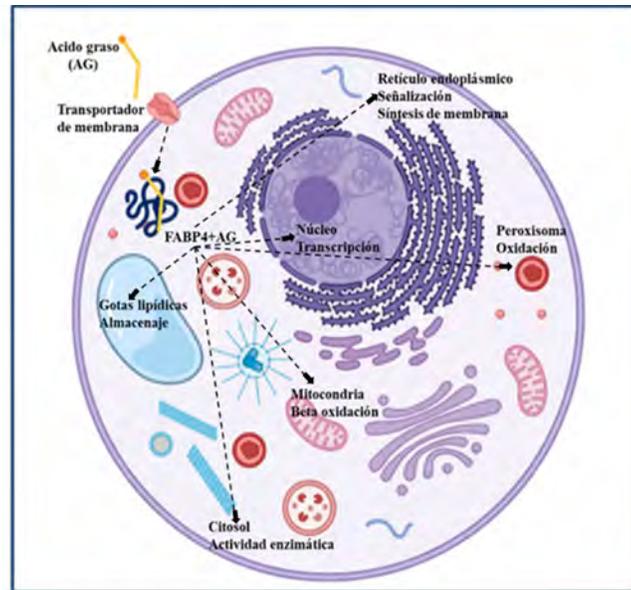


Figura 1. Las FABPs son proteínas citosólicas cuya principal función es unirse a ligandos hidrofóbicos, como ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados, eicosanoides y otros lípidos con alta afinidad, facilitando su distribución para regular procesos de señalización, almacenamiento, actividades enzimáticas, etc., por lo que se consideran chaperonas lipídicas dictando las funciones biológicas de los ácidos grasos.

en adipocitos y en menor cantidad en macrófagos y otros tejidos. Esta proteína es una adipocina que juega un papel importante durante el desarrollo de la obesidad y en las complicaciones asociadas a ella. La FABP4 corresponde del 1 al 6% de todas las proteínas solubles presentes en el tejido adiposo, su expresión se induce durante la diferenciación de adipocitos y es regulada transcripcionalmente por la presencia de ácidos grasos, insulina y PPAR $\gamma$ , molécula que controla la expresión de genes implicados en la adipogénesis y diferenciación de adipocitos, además de que PPAR también regula la mayoría de los procesos intracelulares causantes del metabolismo de los ácidos grasos [18, 19].

En el citosol de los adipocitos la FABP4 cumple con la misma función de facilitar el transporte de lípidos intracelulares. Recientemente se encontró que esta adipocina es secretada a la circulación desde el tejido adiposo pero que carece de una secuencia señal secretora N-terminal, que es necesaria para la secreción clásica de proteínas vía retículo endoplásmico-golgi. Sin embargo, las proteínas también pueden secretarse a través de vías no convencionales [20]. Se han identificado diferentes mecanismos no clásicos, asociados con lipólisis, involucrados en su liberación hacia la circulación: 1) a través de microvesículas derivadas de adipocitos [21]; 2) secretada por los adipocitos en asociación con la lipólisis regulada por la activación de las vías de señalización de la adenil ciclasa (AC)/proteína cinasa A (PKA) y guanilil ciclasa (GC)/proteína cinasa G (PKG), mecanismo que se asocia además a la disminución de los niveles plasmáticos de FABP4 postprandiales y a la supresión de su secreción por la acción anti lipolítica inducida por insulina [22]. También se ha demostrado que la secreción de FABP4 aumenta en presencia de niveles elevados de  $Ca^{2+}$  intracelular, lo que indica la contribución de un mecanismo secretor dependiente del  $Ca^{2+}$  [21].

Por lo anterior, es probable que los niveles circulantes de FABP4 estén regulados por tres factores principales: 1. Su producción en los adipocitos como fuente principal dada la correlación positiva observada con una mayor cantidad de tejido adiposo; 2. El aumento de la secreción por lipólisis que se ha observado en presencia de ayuno y la activación del sistema nervioso simpático de una manera dependiente de los receptores beta adrenérgicos y; 3. La eliminación de la circulación probablemente a través del riñón [23].

Las adipocinas permiten la comunicación entre el tejido adiposo y órganos periféricos, en este caso la liberación de FABP4 desde un adipocito disfuncional en el contexto de obesidad, ha mostrado que tiene efectos directos en el desarrollo del SM. La FABP4 elevada en la circulación sanguínea tiene efectos no solo en células de tejidos periféricos, como las células  $\beta$  del páncreas, hepatocitos y macrófagos, sino también efectos sobre los mismos adipocitos.

En cuanto a los efectos de FABP4 en el metabolismo de la glucosa, esta proteína aumenta el transporte y disposición de ácidos grasos en el interior de la célula, lo que promueve su acumulación y lipotoxicidad, afectando la absorción adecuada de glucosa contribuyendo a potenciar la resistencia a la insulina. También se ha comprobado que participa en el aumento de la gluconeogénesis hepática [24]. Muchos de sus efectos metabólicos relacionados tanto con el metabolismo de los ácidos grasos como en el de la glucosa se han podido corroborar mediante la administración de FABP4 exógena a modelos animales, con la sobreexpresión de esta proteína en cultivos de adipocitos maduros, y en ambos se ha visto un aumento en los depósitos de triglicéridos intracelulares, una mayor respuesta inflamatoria asociada al aumento de las principales citocinas proinflamatorias, alteración en la vía de señalización de la insulina, entre otros [25].

La inflamación crónica de bajo grado presente en trastornos metabólicos está mediada por la activación de vías de señalización como IKK- NF- $\kappa$ B y JNK- AP-1, complejos que actúan como factores de transcripción clave para la expresión de muchos genes implicados en la inflamación, responsables a su vez de inhibir la señalización de insulina, y se ha sugerido que FABP4 participa en la fisiopatología de enfermedades metabólicas y CV promoviendo la activación de estas vías [26].

La FABP4 también se expresa en menores cantidades en macrófagos donde tiene participación en el desarrollo de aterosclerosis ya que modula la respuesta inflamatoria y la acumulación de ésteres de colesterol en los macrófagos lo que favorece la formación de células espumosas, FABP4 tiene efecto al inhibir la vía de ABCA1 (modulador clave de la homeostasis del colesterol en macrófagos) y LXR $\alpha$  (receptor X hepático activador transcripcional de ABCA1). Esta vía se encarga del flujo de salida de colesterol y lipoproteínas a través de la membrana celular de los macrófagos reduciendo la carga de lípidos en las células espumosas, permitiendo la captación de lípidos por HDL-c y su transporte hacia el hígado [27].

Ciertamente FABP4 se expresa principalmente en adipocitos y en menores cantidades en macrófagos, pero recientemente se ha comprobado su expresión en otros órganos como los riñones (capilares peritubulares y células endoteliales de los capilares glomerulares), asociándose con proteinuria y progresión del daño renal, corroborado por una relación inversa entre los niveles de FABP4 sérica/urinaria y la tasa de filtración glomerular (TFG) [28]; debido a lo cual FABP4 podría considerarse como un novedoso biomarcador de insuficiencia renal crónica; sin embargo, aún no se conocen los mecanismos renales de excreción de FABP4 [29].

De igual manera la concentración elevada de FABP4 sérica va de la mano con la progresión de aterosclerosis mediante la inducción de la respuesta inflamatoria, la inhibición de la actividad del óxido nítrico sintasa en el endotelio, así como su participación en la proliferación y migración en el músculo liso vascular [30]. Desde este punto de vista, la enfermedad de las arterias coronarias que generalmente conduce a insuficiencia cardíaca se asocia con alteraciones metabólicas y con obesidad, debido a la acumulación de grasa ectópica en tejidos no adiposos como el corazón, conocida como esteatosis miocárdica, y aumenta el riesgo de eventos CV ya que se liberan adipocinas que actúan directamente sobre los vasos y tejidos que rodea [31].

También se ha demostrado un perfil de expresión diferente de adipocinas, citocinas proinflamatorias y de FABP4 dependiente de la región anatómica donde se encuentre el tejido adiposo, siendo mayor la expresión en grasa pericárdica, perivascular y región inguinal, estos perfiles correlacionan de forma significativa con un mayor riesgo de aterosclerosis debido a que la grasa de estas zonas secretan más cantidades de adipocinas [32, 33].

En infarto agudo de miocardio (IAM), que induce la activación de múltiples sistemas incluido el nervioso simpático se ha observado un efecto sobre el tejido adiposo al favorecer la producción y secreción de adipocinas en respuesta a señales metabólicas. Obokata y cols., encontraron que las concentraciones de FABP4 y troponina T cardíaca, conocido biomarcador de isquemia miocárdica, se elevaron significativamente durante las primeras horas después del inicio del infarto y se mantuvieron aumentadas [34].

La participación directa de FABP4 se ha podido comprobar en diversos estudios realizados en modelos animales con deficiencia

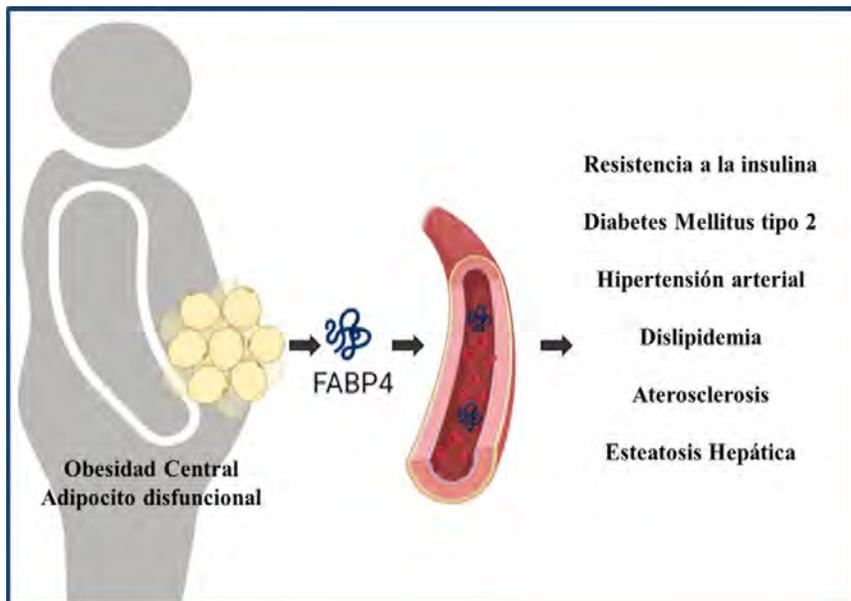


Figura 2. La adipocina FABP4 liberada hacia el torrente sanguíneo en presencia de obesidad y un adipocito disfuncional, se dirige a los tejidos con mayor implicación en el desarrollo del SM. Las concentraciones de FABP4 son significativamente más altas en mujeres que en hombres, pero en ambos se presenta una correlación positiva con el IMC, niveles de triglicéridos, colesterol total, cifras de presión arterial sistólica, circunferencia de la cintura, niveles de IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína C reactiva (PCR) la cual se eleva cuando hay inflamación, apolipoproteína C-III, niveles de glucosa e insulina, índice para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR), creatinina sérica, y una relación negativa con la tasa de filtración glomerular [42].

de esta adipocina en el contexto de obesidad genética y/o inducida por la dieta, donde se ha observado que estos animales están protegidos para desarrollar dislipidemia, hiperglucemia, resistencia a la insulina e hígado graso, así como una reducción notable (90%) de aterosclerosis, aumentando la supervivencia aun con la ingesta de una dieta con alto contenido de grasa [35, 36]. También las concentraciones aumentadas de la proteína se asociaron a un mayor contenido de lípidos en el miocardio, el deterioro de la vía de señalización de la insulina, y la reducción de la captación de glucosa estimulada por insulina. Estos efectos fueron revertidos por la inhibición de FABP4, ya sea usando modelos animales o a través de un inhibidor específico para la proteína (BMS309403), lo que sería una nueva estrategia terapéutica para mejorar la resistencia a la insulina, desarrollo de DMT2, inflamación y aterosclerosis, ya que se disminuye el riesgo de desarrollarlas [37, 38].

## 6. FABP4 como biomarcador del síndrome metabólico

Existe evidencia científica que sustenta la importancia del vínculo de la FABP4 con la obesidad y otras características del SM. La FABP4 actúa como adipocina, y se ha encontrado que en obesidad, los niveles séricos de FABP4 aumentan, lo cual posiciona a esta proteína como una molécula predictora en el desarrollo del SM y de los factores asociados (Figura 2). Independientemente de los factores de riesgos, ya bien conocidos, se ha podido observar, en estudios realizados en poblaciones específicas a las que se les ha dado seguimiento de 5, 10 y 12 años, que los sujetos con niveles basales más altos de FABP4 tenían un perfil de riesgo cardiometabólico progresivamente mayor que aquellos individuos normopeso y con niveles séricos bajos [39-41].

Se ha establecido a la FABP4 como un potencial biomarcador del contenido de lípidos, resistencia a la insulina, DMT2, aterosclerosis y otras patologías asociadas a obesidad y SM. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales FABP4 regula estas funciones no se conocen completamente; por ejemplo, si existe algún mecanismo de señalización intracelular específico que dependa de esta proteína, o si se debe a la activación de algún receptor aún no identificado; así como la importancia de su internalización parcial en la célula; por lo que es crucial conocer sus variaciones o mutaciones genéticas, y cambios en su expresión bajo diferentes circunstancias [43].

Conocer más a fondo los mecanismos de acción de FABP4 y acumular evidencias de su papel en el SM, permitirá el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan modificar sus efectos. Adicionalmente, permitirá la búsqueda de fármacos para tratar la dislipidemia, la hipertensión, y la DMT2, así como prevenir la aterosclerosis, y dado su valor de biomarcador, poder predecir las patologías asociadas al SM. [44]

## 7. Conclusiones

El SM involucra alteraciones cardiometabólicas relacionadas principalmente con obesidad central. El tejido adiposo además de ser un sitio importante para el almacenamiento de energía y para el

metabolismo de lípidos, también juega un papel clave en la homeostasis del organismo gracias a moléculas que libera y que modulan vías metabólicas importantes a nivel local y a distancia, por lo que la disfunción de los adipocitos da lugar a efectos de amplio alcance, contribuyendo a una variedad de trastornos metabólicos y cardiovasculares. El tejido adiposo como órgano endocrino es responsable de la expresión y secreción de múltiples adipocinas como la FABP4, proteína que es posible detectar en sangre desde el inicio y durante todo el desarrollo del SM; por lo tanto, puede utilizarse para el diagnóstico clínico de enfermedades relacionadas con la obesidad. Aún falta mucho por conocer sobre la participación de FABP4 en las vías de regulación metabólica dentro de las células o en los tejidos diana. Las evidencias actuales muestran que esta molécula puede ser un biomarcador emergente para el SM y sus complicaciones. Adicionalmente, las evidencias muestran que la inhibición de FABP4 puede ser un potencial objetivo terapéutico en patologías relacionadas con la obesidad.

## Referencias

- [1] Hernández, J. L. C., González, M. J. C., Galiana, M. A., & Hernández, E. Y. R. Síndrome metabólico, un problema de salud pública con diferentes definiciones y criterios. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 2018; 17(2), 7-24.
- [2] Saklayen, M. G. The global epidemic of the metabolic syndrome. *Current hypertension reports*, 2018; 20(2), 1-8.
- [3] Eizirik, D. L., Pasquali, L., & Cnop, M. Pancreatic  $\beta$ -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nature Reviews Endocrinology*, 2020; 16(7), 349-362.
- [4] World Health Organization. <https://www.who.int/health-topics/diabetes> (accessed april 30, 2022).
- [5] World Health Organization. <https://www.who.int/diabetes/publications> (accessed february 20, 2022).
- [6] Espinosa Brito, A. Hipertensión arterial: cifras para definirla al comenzar 2018. *Revista Finlay*, 2018; 8(1), 66-74.
- [7] Flack, J. M., & Adekola, B. Blood pressure and the new ACC/AHA hypertension guidelines. *Trends in cardiovascular medicine*, 2020; 30(3), 160-164.
- [8] Pacia, M. Z., Mateuszuk, L., Buczek, E., Chlopicki, S., Blazejczyk, A., Wietrzyk, J., ... & Kaczor, A. Rapid biochemical profiling of endothelial dysfunction in diabetes, hypertension and cancer metastasis by hierarchical cluster analysis of Raman spectra. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2016, 47(11), 1310-1317.
- [9] García-Rubio, D. L., de la Mora, M. B., Badillo-Ramírez, I., Cerecedo, D., Saniger, J. M., Benítez-Benítez, J. L., & Villagrán-Muniz, M. Analysis of platelets in hypertensive and normotensive individuals using Raman and Fourier transform infrared-attenuated total reflectance spectroscopies. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2019, 50(4), 509-521.
- [10] Zheng, X., Lv, G., Zhang, Y., Lv, X., Gao, Z., Tang, J., & Mo, J. Rapid and non-invasive screening of high renin hypertension using Raman spectroscopy and different classification algorithms. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 215, 244-248.

- [11] Vekic, J., Zeljkovic, A., Stefanovic, A., Jelic-Ivanovic, Z., & Spasojevic-Kalimanovska, V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism*, 2019; 92, 71-81.
- [12] Unger, R. H., Clark, G. O., Scherer, P. E., & Orci, L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2010; 1801(3), 209-214.
- [13] Porbén, Sergio Santana. "Las adipocitoquinas en la génesis y evolución del síndrome metabólico." *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 20.2. 2010: 14.
- [14] Ellis, David I., & Royston Goodacre. "Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy." *Analyst* 131.8, 2006: 875-885.
- [15] Haka, A. S., Sue, E., Zhang, C., Bhardwaj, P., Sterling, J., Carpenter, C., ... & Dannenberg, A. J. Non-invasive detection of inflammatory changes in white adipose tissue by label-free Raman spectroscopy. *Analytical chemistry*, 2016; 88(4), 2140-2148.
- [16] Furuhashi, M., Ishimura, S., Ota, H., Hayashi, M., Nishitani, T., Tanaka, M., ... & Miura, T. Serum fatty acid-binding protein 4 is a predictor of cardiovascular events in end-stage renal disease. *Plos one*, 2011; 6(11), e27356.
- [17] Furuhashi, M., Sakuma, I., Morimoto, T., Higashiura, Y., Sakai, A., Matsumoto, M., ... & Ueda, S. Independent and distinct associations of FABP4 and FABP5 with metabolic parameters in type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in endocrinology*, 2020; 696.
- [18] Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., & Miura, T. Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clinical medicine insights: cardiology*, 8, 2014; CMC-S17067.
- [19] Furuhashi, M., Yuda, S., Muranaka, A., Kawamukai, M., Matsumoto, M., Tanaka, M., ... & Miura, T. Circulating fatty acid-binding protein 4 concentration predicts the progression of carotid atherosclerosis in a general population without medication. *Circulation Journal*, 2018; 82(4), 1121-1129.
- [20] Kralisch, S., Ebert, T., Lossner, U., Jessnitzer, B., Stumvoll, M., & Fasshauer, M. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *International journal of obesity*, 2014; 38(9), 1251-1254.
- [21] Ertunc, M. E., Sikkeland, J., Fenaroli, F., Griffiths, G., Daniels, M. P., Cao, H., ... & Hotamisligil, G. S. Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity. *Journal of lipid research*, 2015; 56(2), 423-434.
- [22] Mita, T., Furuhashi, M., Hiramitsu, S., Ishii, J., Hoshina, K., Ishimura, S., ... & Miura, T. FABP4 is secreted from adipocytes by adenyl cyclase-PKA-and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms. *Obesity*, 2015; 23(2), 359-367.
- [23] Shrestha, S., Sunaga, H., Hanaoka, H., Yamaguchi, A., Kuwahara, S., Umbarawan, Y., ... & Iso, T. Circulating FABP4 is eliminated by the kidney via glomerular filtration followed by megalin-mediated reabsorption. *Scientific reports*, 2018; 8(1), 1-9.
- [24] Rodríguez-Calvo, R., Girona, J., Rodríguez, M., Samino, S., Barroso, E., de Gonzalo-Calvo, D., ... & Masana, L. Fatty acid binding protein 4 (FABP4) as a potential biomarker reflecting myocardial lipid storage in type 2 diabetes. *Metabolism*, 2019; 96, 12-21.
- [25] Dou, H. X., Wang, T., Su, H. X., Gao, D. D., Xu, Y. C., Li, Y. X., & Wang, H. Y. Exogenous FABP4 interferes with differentiation, promotes lipolysis and inflammation in adipocytes. *Endocrine*, 2020; 67(3), 587-596.
- [26] Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., & Miura, T. Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clinical medicine insights: cardiology*, 2014; 8, CMC-S17067.
- [27] Xu, A., Tso, A. W., Cheung, B. M., Wang, Y., Wat, N. M., Fong, C. H., ... & Lam, K. S. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation*, 2007; 115(12), 1537-1543.
- [28] Tanaka, M., Furuhashi, M., Okazaki, Y., Mita, T., Fuseya, T., Ohno, K., ... & Miura, T. Ectopic expression of fatty acid-binding protein 4 in the glomerulus is associated with proteinuria and renal dysfunction. *Nephron Clinical Practice*, 2014; 128(3-4), 345-351.
- [29] Furuhashi, M., Ishimura, S., Ota, H., Hayashi, M., Nishitani, T., Tanaka, M., ... & Miura, T. Serum fatty acid-binding protein 4 is a predictor of cardiovascular events in end-stage renal disease. *Plos one*, 2011; 6(11), e27356.
- [30] Furuhashi, M., Yuda, S., Muranaka, A., Kawamukai, M., Matsumoto, M., Tanaka, M., ... & Miura, T. Circulating fatty acid-binding protein 4 concentration predicts the progression of carotid atherosclerosis in a general population without medication. *Circulation Journal*, 2018; 82(4), 1121-1129.
- [31] Vural, B., Atalar, F., Ciftci, C., Demirkan, A., Susleyici-Duman, B., Gunay, D., ... & Buyukdevrim, A. S. Presence of fatty-acid-binding protein 4 expression in human epicardial adipose tissue in metabolic syndrome. *Cardiovascular Pathology*, 2008; 17(6), 392-398.
- [32] Gormez, S., Erdim, R., Akan, G., Caynak, B., Duran, C., Gunay, D., ... & Atalar, F. Relationships between visceral/subcutaneous adipose tissue FABP4 expression and coronary atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. *Cardiovascular Pathology*, 2020; 46, 107192.
- [33] Furuhashi, M., Fuseya, T., Murata, M., Hoshina, K., Ishimura, S., Mita, T., ... & Miura, T. Local production of fatty acid-binding protein 4 in epicardial/perivascular fat and macrophages is linked to coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2016; 36(5), 825-834.
- [34] Obokata, M., Iso, T., Ohyama, Y., Sunaga, H., Kawaguchi, T., Matsui, H., ... & Kurabayashi, M. Early increase in serum fatty acid binding protein 4 levels in patients with acute myocardial infarction. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*, 2018; 7(6), 561-569.
- [35] Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*. 2000; 141:3388-3396.
- [36] Makowski, L., Boord, J. B., Maeda, K., Babaev, V. R., Uysal, K. T., Morgan, M. A., ... & Linton, M. F. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nature medicine*, 2001; 7(6), 699-705.
- [37] Yao, F., Jiang, D. D., Guo, W. H., Guo, L. S., Gao, M. M., Bai, Y., ... & Zhang, L. S. FABP4 inhibitor attenuates inflammation and endoplasmic reticulum stress of islet in leptin receptor knockout rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020; 24(24), 12808-12820.

- [38] Cai, H., Liu, Q., Gao, D., Wang, T., Chen, T., Yan, G., ... & Zhu, W. Novel fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors: virtual screening, synthesis and crystal structure determination. *European journal of medicinal chemistry*, 2015; 90, 241-250.
- [39] Xu, A., Tso, A. W., Cheung, B. M., Wang, Y., Wat, N. M., Fong, C. H., ... & Lam, K. S. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation*, 2007; 115(12), 1537-1543.
- [40] Tso, A. W., Xu, A., Sham, P. C., Wat, N. M., Wang, Y., Fong, C. H., ... & Lam, K. S. Serum adipocyte fatty acid-binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: A 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes care*, 2007; 30(10), 2667-2672.
- [41] Chow, W. S., Tso, A. W. K., Xu, A., Yuen, M. M. A., Fong, C. H. Y., Lam, T. H., ... & Lam, K. S. L. Elevated circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict incident cardiovascular events in a community-based cohort: a 12-year prospective study. *Journal of the American Heart Association*, 2013; 2(1), e004176.
- [42] Li, J. C., Wu, D. A., Hou, J. S., Subeq, Y. M., Chen, H. D., & Hsu, B. G. High serum adipocyte fatty acid binding protein is associated with metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Research*, 2016. 2016
- [43] Furuhashi, M., Sakuma, I., Morimoto, T., Higashiura, Y., Sakai, A., Matsumoto, M., ... & Ueda, S. Independent and distinct associations of FABP4 and FABP5 with metabolic parameters in type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in endocrinology*, 2020; 696.
- [44] Chung, J. Y., Ain, Q. U., Song, Y., Yong, S. B., & Kim, Y. H. Targeted delivery of CRISPR interference system against Fabp4 to white adipocytes ameliorates obesity, inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Genome research*, 2019; 29(9), 1442-1452.

### RICARDO ESPINOSA TANGUMA

Médico cirujano, maestro en ciencias (fisiología) y doctor en ciencias (fisiología) por la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Realizó una estancia postdoctoral en el departamento de Fisiología y Biofísica en la Universidad de Medicina y Ciencias Rosalind Franklin en Chicago, Illinois, USA, y posteriormente fue profesor visitante del departamento de Fisiología y Farmacología en la Universidad de Western Ontario, Canadá. Desde 1994 es profesor de tiempo completo en el departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Es autor/co-autor de 28 artículos científicos, tres artículos de divulgación, tres capítulos de libros.

Bajo su tutoría se han graduado dos estudiantes de licenciatura, 20 estudiantes de maestría, tres estudiantes de doctorado, y cuatro doctores han realizado estancias posdoctorales en su laboratorio.

Ha impartido cursos de pregrado y posgrado de Fisiología, Farmacología y Anatomía.

Su línea de investigación está dirigida a entender los cambios fisiológicos (contractilidad y migración de las células musculares lisas vasculares) que suceden en el músculo liso vascular en el síndrome metabólico y en la diabetes *mellitus* experimentales. Asimismo, entender los mecanismos por los cuales las células endoteliales sienten los cambios en el *shear-stress*.



### GUADALUPE ELENA DONJUÁN LOREDO

Maestra en Ciencias Biomédicas Básicas, es médica cirujana egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), de la maestría en Ciencias Biomédicas Básicas, actualmente cursa el octavo semestre del doctorado en Ciencias Biomédicas Básicas en el departamento de Fisiología y Biofísica, de la Facultad de Medicina, UASLP, bajo la dirección del doctor Ricardo Espinosa Tanguma. Ha laborado en la Secretaría de Salud del gobierno del Estado de San Luis Potosí, en el Instituto Mexicano del Seguro Social e instituciones privadas. Se ha desempeñado como profesora de las asignaturas de Anatomía y Fisiología Humanas a nivel licenciatura. Su tesis de doctorado se enfoca en la búsqueda de biomarcadores de síndrome metabólico mediante métodos no invasivos. Ha publicado cuatro artículos en revistas internacionales y de divulgación, y ha participado en cinco congresos internacionales.





# Dimorfismo sexual en la resistencia a la insulina fisiológica y patológica en un modelo de síndrome metabólico en rata

Rosa Isela Ortiz-Huidobro, Myrian Velasco y Marcia Hiriart  
Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**Resumen:** La insulina es una hormona anabólica producida por las células  $\beta$  pancreáticas. Una de sus principales funciones es mantener la homeostasis de la glucosa. Además, la sensibilidad a las acciones de la insulina es diferentes entre mujeres y hombres. Cuando la respuesta metabólica de los órganos a la insulina se daña se produce resistencia a la insulina. Se ha estudiado bastante la resistencia a la insulina como un marcador temprano de disfunción metabólica, como un componente principal dentro del síndrome metabólico y un antecedente común en personas que desarrollan diabetes *mellitus* tipo 2. Sin embargo, la resistencia a la insulina también aparece en contextos fisiológicos, de manera transitoria, durante ventanas críticas del desarrollo. En este capítulo describimos la secreción y las acciones de la insulina destacando el papel del dimorfismo sexual en estos procesos. Abordamos la resistencia a la insulina fisiológica durante diferentes etapas del desarrollo y profundizamos en sus mecanismos moleculares. Posteriormente describimos la fisiopatología del síndrome metabólico y destacamos el papel de la resistencia a la insulina dentro de los signos que conforman esta disfunción. Detallamos los mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina patológica en ambos sexos. Finalmente, discutimos la relación entre la resistencia a la insulina y la enfermedad de Covid 19. Debido al aumento en la gravedad de los signos que presentan pacientes con daño en la homeostasis de la glucosa cuando contraen la infección por el virus SARS-CoV-2, sugerimos profundizar en el conocimiento de los mecanismos de la resistencia a la insulina en ambos sexos.

## Abreviaturas

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GLP-1	Péptido-1 parecido a glucagon
GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa
IFG	Alteración de la glucemia en ayuno
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico-1
IGT	Intolerancia a la glucosa
IKK $\beta$	Cinasa del inhibidor del factor nuclear $\kappa\beta$
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JNK	Cinasa N-terminal c-Jun
LOX-1	Receptor-1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas parecido a lectina
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
mTORC1	Complejo 1 blanco de la rapamicina en mamíferos
NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólica
NF- $\kappa\beta$	Factor nuclear- $\kappa\beta$
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno-1
PDK1	Cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos
PI3K	Cinasa 3 de fosfatidilinositol
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PP2A	Fosfatasa de proteína 2A
PTP-1B	Fosfatasa-1B de proteínas con actividad en tirosina
RAAS	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
S6K1	Cinasa 1 de la proteína ribosomal S6
SIR	Receptor soluble a insulina
SOCs	Supresores de la señalización de citocinas
TNF $\alpha$	Factor de crecimiento tumoral $\alpha$

## 1. Introducción

### 1.1. La resistencia a la insulina

La homeostasis de la glucosa es el balance entre la compleja relación de la insulina secretada por las células  $\beta$  pancreáticas y sus tejidos diana, la acción de las hormonas que la contrarregulan, y la modulación del sistema nervioso central. En los mamíferos, las células  $\beta$  pancreáticas son las únicas células que secretan insulina [1].

La resistencia a la insulina es un evento metabólico en el cual hay insulina circulante en el organismo, en ocasiones en exceso, pero esta no actúa de manera eficiente. La resistencia a la insulina la podemos considerar como una ventaja evolutiva, ya que si hay mucha insulina y no existe una contrarregulación adecuada se presenta una baja súbita en la cantidad de glucosa circulante. Esta condición, llamada hipoglucemia es peligrosa especialmente para las células del sistema nervioso que dependen del consumo de glucosa minuto a minuto. Podemos vivir con resistencia a la insulina durante muchos años, en cambio la hiperinsulinemia con hipoglucemia nos puede matar en minutos.

Existen dos formas de resistencia a la insulina, la fisiológica y la patológica. La primera se presenta en etapas en las que hay cambios rápidos en el organismo, como el tercer trimestre del embarazo, y la pubertad; nuestro grupo describió otra forma de resistencia a insulina alrededor del destete en ratas [2]. Resulta interesante analizar los mecanismos de resistencia periférica de los principales tejidos sensibles a insulina en la resistencia a la insulina fisiológica y patológica, separándolos por sexos, ya que su presentación es sexualmente dimórfica, aun antes de circular las hormonas sexuales.

## 2. La secreción de insulina

La secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, por sus siglas en inglés) inicia cuando aumenta el nivel de glucosa en la sangre, por arriba de 7 mM de glucosa, lo que equivale a 126 mg/dL. La glucosa es transportada al interior de las células  $\beta$  por los glucotransportadores GLUT1 y GLUT3 en humanos o GLUT2 en roedores. La glucosa es fosforilada por la enzima glucocinasa (o hexocinasa IV) produciendo glucosa-6-fosfato, la cual es oxidada hasta piruvato a través de la glucólisis. El piruvato se descarboxila, por acción de la enzima piruvato deshidrogenasa, dando lugar a acetil-CoA, el principal sustrato del ciclo de Krebs. En las mitocondrias a partir del ciclo de Krebs y posteriormente la fosforilación oxidativa se produce ATP [1].

En las células  $\beta$  pancreáticas el aumento en la relación ATP/ADP favorece el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) y aunado a la actividad de canales catiónicos no selectivos tipo TRP la membrana se despolariza. Cuando se alcanza el potencial de activación de canales sensibles a voltaje se abren canales de sodio y calcio tipo T, continúa la despolarización hasta que se abren los canales de calcio tipo L, que son los que tienen una conductancia mayor al calcio. El aumento de la concentración de calcio intracelular promueve la exocitosis de los gránulos que contienen insulina. La GSIS es pulsátil y se caracteriza por ser bifásica. La primera fase es rápida y transitoria y la segunda fase es lenta y dura tanto como se mantiene el estímulo [1].

Se ha identificado que la GSIS presenta dimorfismo sexual. La testosterona en las células  $\beta$  pancreáticas aumenta los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), lo cual activa a la proteína cinasa A (PKA), que modula la actividad de canales iónicos y amplifica el efecto del péptido-1 parecido a glucagon (GLP-1), una incretina que potencia la secreción de insulina [3].

Por otro lado, el estradiol a través de cinasas como la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) activa factores de transcripción insulínotropicos como Neuro D1 que regula la expresión del gene de insulina. Las mujeres presentan mayor producción y secreción de insulina, así como mayor respuesta a incretinas que los hombres [4]. La supervivencia de las células  $\beta$  es mayor en mujeres. Los estrógenos también previenen la apoptosis inducida por estrés celular y lipotoxicidad [5]. Así también, a través de biopsias de páncreas de donadores humanos sanos se estimó que los islotes de mujeres contienen 6% más células  $\beta$  que los de hombres [4].

## 3. Principales acciones de la insulina a través de sus vías de señalización

Una vez que la insulina es liberada hacia el torrente sanguíneo se une a sus receptores en las células diana. El receptor de insulina es una proteína heterotetramérica localizada en la membrana plasmática de las células. Todos los órganos expresan receptores a insulina, sin embargo, sus funciones en cada órgano son diferentes y altamente específicas [6].

La unión de la insulina a las subunidades  $\alpha$  de su receptor promueve cambios conformacionales de éste, acercando las subunidades  $\beta$  intracelulares, lo que promueve su transfosforilación, activando su función enzimática de cinasa de tirosina. Esta actividad fosforila otras proteínas intracelulares, promoviendo una cascada de fosforilaciones que modula diferentes vías de señalización. Las principales acciones metabólicas de la insulina son reguladas por la vía canónica de la cinasa 3 de fosfatidilinositol/proteína cinasa B (PI3K/Akt), mientras que la mayoría de sus acciones mitogénicas son reguladas por la vía de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) [7].

En la vía de señalización PI3K/Akt el receptor de insulina activado fosforila en residuos de tirosina a la proteína sustrato del receptor de insulina (IRS), esta proteína adaptadora favorece la actividad de la cinasa PI3K la cual a través de su subunidad catalítica produce fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3). En la membrana, el fosfolípido PIP3 es un sitio de unión de cinasas como la cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1), esta cinasa junto con la proteína blanco de la rapamicina complejo 2 (mTORC2) fosforilan y activan a Akt. La cinasa de serina/treonina Akt es un nodo de regulación de la señalización de la insulina ya que fosforila y modula la actividad de una gran variedad de sustratos (Figura 1) [7].

La insulina es una hormona anabólica que regula el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas a través de la vía de señalización de PI3K/Akt. Una de sus principales funciones es mantener la homeostasis de la glucosa favoreciendo su internalización en el músculo esquelético y el tejido adiposo a través del glucotransportador GLUT4. En el hígado, la insulina favorece la síntesis de glucógeno e inhibe la gluconeogénesis y regula la síntesis y exportación de lípidos. En el músculo, la insulina favorece la síntesis de glucógeno mientras que en el tejido adiposo esta hormona aumenta la lipogénesis e inhibe la lipólisis (Figura 1) [7].

La insulina también tiene funciones autocrinas en las células  $\beta$  pancreáticas ya que favorece la proliferación celular a través de la regulación de proteínas que modulan el ciclo celular, como la cinasa dependiente de ciclina 1/2 (Cdk1/2) o la ciclina D2. Por otro lado, favorece la supervivencia celular inhibiendo vías apoptóticas como la vía del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y la acción de las caspasas 3 y 9. Finalmente, la insulina dirige su síntesis y secreción regulando la transcripción de genes, la secreción de incretinas y la actividad de canales de potasio sensibles a ATP y dependientes de voltaje ( $K_{ATP}$  y  $K_v$ , respectivamente) (figura 1) [8].

La sensibilidad a la insulina depende de la transducción eficiente de la señal a través de sus vías de señalización y su interrelación con múltiples vías metabólicas. Factores como el flujo de sustratos y la microbiota intestinal son fundamentales en la respuesta fisiológica de los órganos a la insulina [9].

La sensibilidad a la insulina difiere entre los sexos. La sensibilidad a la insulina es más alta en mujeres en edad reproductiva que en hombres de la misma edad. Estudios clínicos y experimentales indican que después de la pubertad los estrógenos tienen un papel protector en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina [4].

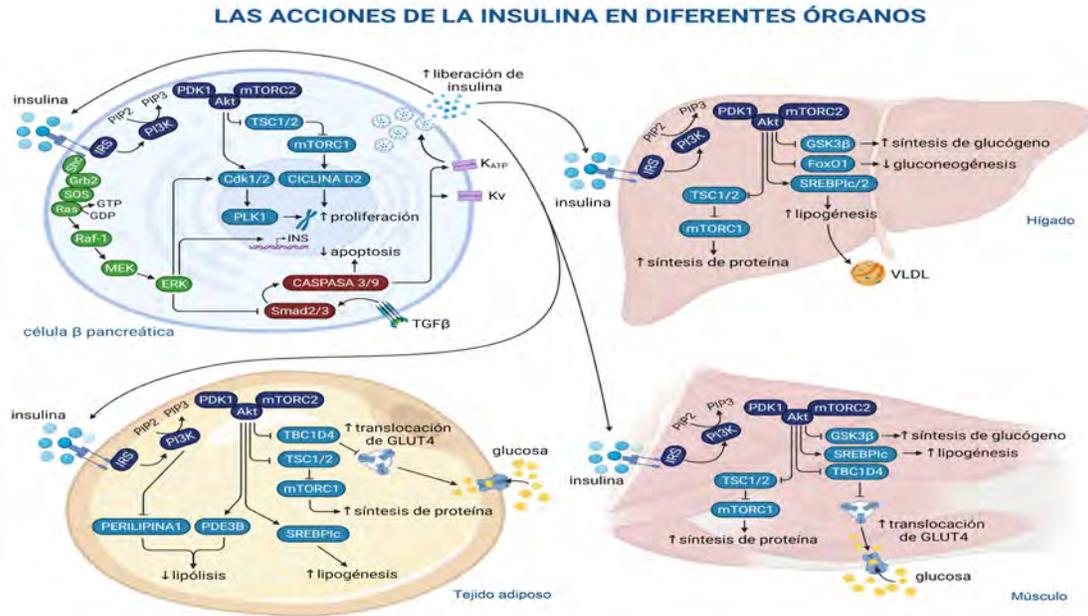


Figura 1. La insulina es sintetizada y secretada por las células  $\beta$  pancreáticas y viaja a través del torrente sanguíneo hasta que se une a los receptores a insulina expresados en los órganos blanco. Esta hormona unida a su receptor inicia la cascada de señalización a través de la vía PI3K/Akt, así la insulina regula funciones metabólicas en el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. En el hígado la insulina favorece la síntesis de glucógeno, proteínas y lípidos e inhibe la gluconeogénesis. En el músculo esquelético y el tejido adiposo dirige la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, lo cual favorece la internalización de glucosa. En el músculo esquelético también regula la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas mientras que en el tejido adiposo favorece la lipogénesis e inhibe la lipólisis. En las células  $\beta$  pancreáticas la insulina a través de las vías de señalización de PI3K/Akt y MAPK regula su propia síntesis y secreción, favorece la proliferación celular e inhibe vías apoptóticas. Shc: proteína con dominio de homología a Src y colágeno; Grb2: proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento; SOS: factor intercambiador de nucleótidos de guanina *son of sevenless*; Ras: proteínas ras (GTPasas pequeñas); Raf-1: proteína cinasa serina/treonina proto-oncogeno; MEK: cinasa de la cinasa MAP ERK; TSC1/2: complejo de esclerosis tuberosa 1/2; PLK1: cinasa 1 parecida a polo; Smad: supresor de *mothers against decapentaplegic*; GSK3 $\beta$ : cinasa 3 $\beta$  de la sintasa de glucógeno; FoxO1: proteína O1 con dominio *forkhead box*; SREBP1c/2: proteína 1c/2 de unión a elementos reguladores de esteroides; TBC1D4: miembro de la familia de dominio TBC1 4; PDE3B: fosfodiesterasa 3B. Imagen elaborada con BioRender.com.

La expresión y la activación de las proteínas de señalización de la insulina es diferente entre hombres y mujeres, y modulan de manera distinta el metabolismo en los órganos [10], ejemplo de ello es la mayor actividad lipogénica y lipolítica observada en el tejido adiposo visceral de hembras, lo cual evita la hipertrofia celular [11]. Además, el tejido adiposo de mujeres produce mayor cantidad de adipocinas como leptina y adiponectina, la cual aumenta la sensibilidad a la insulina en los tejidos [12]. Por otro lado, aunque en las hembras se ha observado una mayor cantidad de ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) circulantes y mayor acumulación de lípidos en el músculo esquelético, este órgano también presenta mayor cantidad y actividad mitocondrial, oxidación de lípidos y mayor internalización de glucosa. Esto se debe a que el músculo esquelético en las hembras cuenta con mayor densidad de fibras musculares tipo 1 lo cual lo hace altamente sensible a la insulina [4].

### 3.1. La regulación de la señalización de la insulina

Las acciones de la insulina son finamente reguladas por diferentes mecanismos. La insulina modula sus propias funciones a través de su dinámica de secreción, pulsátil y bifásica [13]. Su liberación

está ligada a ciclos circadianos dirigidos por los factores de transcripción CLOCK y BMAL1 que modulan genes que participan en la biosíntesis, transporte y exocitosis de insulina. La oscilación en la expresión de estos genes, conocidos como genes reloj, está sincronizada a ciclos de luz-oscuridad y depende también de la concentración de glucosa extracelular. El aumento en la secreción de insulina estimulada por glucosa es más elevado durante periodos de vigilia, donde aumenta la expresión de los genes reloj, en comparación con periodos de sueño [14].

A nivel del receptor, el reciclamiento del receptor o su modificación a través de mecanismos proteolíticos observados durante la hiperglucemia detienen su señalización [15]. La señalización de la insulina posreceptor es regulada en múltiples niveles por la transcripción, las modificaciones postraduccionales, la localización y la cinética enzimática de las proteínas de la vía. Otros mecanismos como la inhibición de la señalización se llevan a cabo por la acción de cinasas y fosfatasa de la propia vía (desensibilización homóloga) o de otras vías de señalización (desensibilización heteróloga) [13].

#### 4. La resistencia a la insulina en contextos fisiológicos

El desbalance y la disminución de la respuesta metabólica de los órganos a la insulina genera resistencia a la insulina. La alta concentración de glucosa e insulina en el ayuno es un signo característico de la resistencia a la insulina. Se ha identificado en diferentes modelos de resistencia a la insulina una elevada concentración de FFA en circulación, así como el aumento en la producción de glucosa hepática lo cual exacerba esta condición. La hiperinsulinemia favorece un estímulo sostenido a la vía de señalización de la insulina que dirige las acciones metabólicas, lo cual induce progresivamente la desensibilización a la insulina por varios mecanismos celulares [7].

Durante algunas etapas del desarrollo se presenta esta condición de manera fisiológica y transitoria y se desconoce bastante de los mecanismos moleculares implicados.

##### 4.1. La resistencia a la insulina durante el desarrollo posnatal

Durante ventanas críticas del desarrollo se han identificado cambios funcionales en los órganos que responden a modificaciones en la demanda de sustratos, proliferación celular o remodelación y maduración de los tejidos. Estos cambios fisiológicos son necesarios en el desarrollo y son altamente sensibles a estímulos exógenos lo cual los hace críticos ya que algún desequilibrio puede promover alteraciones metabólicas que persisten hasta la edad adulta [12].

Nuestro grupo de investigación ha estudiado el desarrollo posnatal en ratas Wistar, específicamente alrededor del destete, que en condiciones de laboratorio se da al día 20 posnatal. Durante esta ventana crítica del desarrollo hemos identificado una reorganización en la arquitectura de los islotes pancreáticos, como cambios en la vasculatura, en la inervación de fibras simpáticas y la formación de la cápsula que rodea al islote [16]. Al día 20 posnatal, también se ha observado un incremento en la masa de las células  $\beta$  y  $\alpha$  pancreáticas, además de cambios relacionados con la maduración funcional de las células  $\beta$ . La secreción de insulina en las células  $\beta$  a esta edad no responde al aumento de la glucosa en la sangre [2]. Además, se identificó expresión diferencial de genes relacionados con la modulación de la actividad eléctrica y el ciclo celular entre células  $\beta$  de ratas al día 20 posnatal y en edad adulta [17].

Uno de los hallazgos en los que hemos centrado nuestra atención es la presencia de resistencia a la insulina fisiológica en ratas macho al día 20 posnatal. Estas ratas presentan niveles elevados de glucosa e insulina en el ayuno, baja sensibilidad a la insulina sistémica e intolerancia a la glucosa. Esta condición se presenta de manera transitoria, ya que al día 28 posnatal estos signos se atenúan [2]. Nuestros siguientes estudios se basan en dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a la insulina en ratas machos y hembras durante este contexto fisiológico.

La resistencia a la insulina es más prevalente en hombres que en mujeres; desde etapas tempranas del desarrollo existe diferencia en la sensibilidad a la insulina entre los sexos [12].

El dimorfismo sexual en la respuesta a la insulina durante el desarrollo temprano no está directamente relacionado con la acción

de las hormonas sexuales, como en la edad adulta. Otros factores cobran más importancia como la programación metabólica durante el desarrollo fetal y neonatal que juega un papel importante en el fenotipo metabólico de las crías al nacimiento. Estudios en modelos de roedores de madres e incluso abuelas obesas, sugieren que las crías hembras son más susceptibles a la disrupción de la homeostasis de la glucosa y daño mitocondrial, mientras que los machos lo son a cambios en la adiposidad y el peso corporal [12].

La regulación epigenética durante la gestación puede ser trasladada a cambios permanentes en la expresión de genes durante el desarrollo de los neonatos. La obesidad materna en ratones causa un incremento en la expresión de miRNA126 en el tejido adiposo de las crías, lo cual genera disminución en la traducción del mRNA *Irs1* y resistencia a la insulina [18]. Por otro lado, la expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa y los lípidos localizados en el cromosoma X [19] podrían ser el componente que marca las diferencias en la sensibilidad a la insulina entre machos y hembras en etapas tempranas del desarrollo.

##### 4.2. La resistencia a la insulina durante la pubertad

La pubertad se caracteriza por numerosos cambios fisiológicos, físicos, metabólicos y endocrinos que favorecen el desarrollo de la capacidad reproductiva. Durante esta etapa de transición hay un incremento en la liberación de hormonas sexuales, hormona de crecimiento (GH) y factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1). En la pubertad se ha identificado resistencia a la insulina y un aumento en la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas. En los jóvenes sanos la resistencia a la insulina es evidente a la mitad de la pubertad y se atenúa al término de esta etapa [20].

A través de diferentes estudios usando la técnica de *clamp* hiperinsulinémico-euglucémico en humanos y pruebas de sensibilidad a la insulina en ratones, se encontró que las mujeres y las hembras sanas durante la pubertad tienen mayor resistencia a la insulina que los hombres y machos [20]. En ambos sexos se identificó un incremento de la proteólisis, lipólisis y oxidación de ácidos grasos comparados con sujetos adultos [21].

Uno de los mecanismos propuestos en el establecimiento de la resistencia a la insulina en la pubertad es el nivel elevado de GH en circulación. La GH y la insulina son hormonas que están contra reguladas respecto al metabolismo energético y el crecimiento celular a través de diferentes vías de señalización que convergen y se regulan una a otra. Las concentraciones elevadas de GH e IGF-1 inducen resistencia a la insulina por inhibición de la vía PI3K/Akt [20].

##### 4.3. La resistencia a la insulina durante el embarazo

Durante el embarazo, el crecimiento y desarrollo del feto depende del flujo apropiado de nutrientes de la madre al feto. La glucosa es una fuente de energía muy importante para el desarrollo fetal. El transporte de glucosa a través de la placenta es un proceso pasivo que depende del gradiente de concentración entre la circulación materna y fetal. A lo largo del embarazo este gradiente se mantiene debido al aumento de los niveles de glucosa en la circulación ma-

terna. La placenta secreta hormonas que incrementan la resistencia a la insulina y la producción de glucosa hepática en la madre, lo cual asegura el flujo necesario de glucosa hacia el feto [22]. Lo anterior es regulado por la madre a través de un fino balance entre la resistencia a la insulina y el incremento de la respuesta de las células  $\beta$  pancreáticas, secretando más insulina [22].

La masa de las células  $\beta$  pancreáticas aumenta por un incremento de la proliferación e hipertrofia celular. En consecuencia, la secreción de insulina aumenta casi al doble, condición que se reestablece después de 6 a 12 semanas posparto. Esta adaptación fisiológica de las células  $\beta$  pancreáticas ocurre antes de la aparición de resistencia a la insulina materna [23].

La sensibilidad a la insulina disminuye en cerca del 50% durante el embarazo. Los mecanismos asociados a la resistencia a la insulina en esta condición se encuentran en amplia investigación. Se ha identificado que los niveles de leptina aumentan y se ha reportado una correlación negativa con la sensibilidad a la insulina sugiriendo que la hiperleptinemia está relacionada con la resistencia a la insulina durante este periodo. Otros autores también destacan una correlación negativa entre altos niveles de GH y la baja sensibilidad a la insulina en mujeres embarazadas sanas [24].

El riesgo de acentuar esta resistencia a la insulina está asociado con daño en las células  $\beta$  pancreáticas incluso antes de la concepción. En algunos casos, bajo estas condiciones las células  $\beta$  no responden a la demanda aumentada de insulina durante el embarazo, generando hiperglucemia o diabetes gestacional. Un estudio danés mostró que el 40% de mujeres que presentan diabetes gestacional desarrollan diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) en los años subsecuentes al embarazo [24].

#### 4.4. La resistencia a la insulina durante el envejecimiento

Durante el envejecimiento hay un declive en la función de los tejidos debido a modificaciones en la composición celular, señalización endocrina y remodelación de los órganos. El envejecimiento *per se* juega un importante papel en el desarrollo de resistencia a la insulina y estrés oxidativo. Durante el proceso de envejecimiento disminuye la sensibilidad a la insulina periférica y se favorece la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas. La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) dañan al DNA, a las proteínas y los lípidos produciendo daño celular [25].

Los cambios sustanciales en la función y distribución del tejido adiposo a lo largo de la vida son la causa más probable del establecimiento de la resistencia a la insulina durante el envejecimiento. El aumento del tejido adiposo con la edad se da por hiperplasia en hembras, lo cual lo mantiene funcional por más tiempo, mientras que en los machos aumenta por hipertrofia y genera complicaciones metabólicas [11].

La resistencia a la insulina inducida por la edad es más prevalente en hombres que en mujeres. En ratas macho de 14 meses de edad comparadas con ratas más jóvenes de 7 meses de edad se observa un decremento en la expresión del gene del receptor de insulina, mayor deposición de lípidos hepáticos e inflamación del tejido adiposo blanco además de menores niveles de adiponectina y aumento de resistencia a la leptina [11].

Después de la menopausia tras la caída en los niveles de estrógenos, en las mujeres se presentan alteraciones metabólicas, entre ellas la disminución de la sensibilidad a la insulina y daños en la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, la disfunción metabólica desde edades tempranas en hombres, junto con otros factores como la dieta y el estilo de vida determinan una mayor prevalencia de enfermedades metabólicas asociadas con la edad en hombres que en mujeres [11].

### 5. La resistencia a la insulina en el síndrome metabólico

A diferencia de la resistencia a la insulina que ocurre en procesos fisiológicos, la resistencia a la insulina en contextos patológicos como en el síndrome metabólico y DM2, ha sido más estudiada. Además, esta condición metabólica ha tomado relevancia en la reciente pandemia de la enfermedad de coronavirus 19 (Covid-19), producida por el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-Cov2), ya que se ha demostrado que los pacientes con DM2 son más susceptibles a la Covid-19, y producen una forma más severa de la enfermedad [26].

#### 5.1. El síndrome metabólico

El SM, también mal llamado “síndrome de resistencia a la insulina” se define como un conjunto de signos metabólicos que aumentan el riesgo de padecer DM2 (5 veces), enfermedades cardiovasculares (2 veces) y algunos tipos de cáncer. Además, el SM se ha asociado con la aparición de padecimientos como la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD por sus siglas en inglés) y el síndrome de ovario poliquístico [27].

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS) los signos que componen el SM incluyen: obesidad central (índice de masa corporal (IMC) mayor a 30 kg/m<sup>2</sup> o circunferencia abdominal mayor a 88 cm en mujeres y mayor a 90 cm en hombres), hipertensión arterial (mayor a 140 mmHg de presión sistólica), dislipidemia (hipertrigliceridemia mayor a 150 mg/dL), disminución en las lipoproteínas de alta densidad asociadas a colesterol (HDL-C, menor a 40 mg/dL en mujeres y menor a 35 mg/dL en hombres), alteración en la glucemia en ayuno (mayor a 100 mg/dL), intolerancia a la glucosa (glucosa plasmática entre 140 y 199 mg/dL a las dos horas en una curva de tolerancia a la glucosa oral) y resistencia a la insulina, la cual se ha propuesto como el signo más importante en el SM [1].

Los criterios para la definición clínica del SM son la presencia de por lo menos 3 de los signos antes descritos. Para la OMS uno de esos 3 signos debe ser la resistencia a la insulina o la alteración de la glucemia en ayuno [28].

##### 5.1.1. Factores de riesgo en el desarrollo de síndrome metabólico

En cuanto a la etiología del SM, es ampliamente aceptado que factores genéticos y factores ambientales son las principales causas del desarrollo de este síndrome. La prevalencia del SM varía alrededor del mundo y hay varios factores que pueden influenciar

esta prevalencia como: la dieta, el estilo de vida, algunos contaminantes ambientales, la educación, la edad y el sexo del individuo [29].

### 5.1.2. Dimorfismo sexual en el síndrome metabólico

Se ha propuesto que existen diferencias entre mujeres y hombres en prácticamente todos los signos que componen el SM. La prevalencia de obesidad y sobrepeso en el SM ha afectado principalmente a las mujeres (38%) en comparación con los hombres (36%), aunque esta diferencia no es grande, la localización de esa adiposidad sí lo es. Las mujeres acumulan grasa principalmente en el tejido adiposo subcutáneo (femoral y glúteo), mientras que en los hombres, se localiza en el tejido adiposo visceral y este último ha sido asociado con mayor riesgo cardiovascular [29].

La hipertensión arterial es precursora de enfermedades cardiovasculares y es el signo más frecuente del SM en los hombres. Se ha demostrado que los hombres presentan un incremento en la presión arterial durante y después de la adolescencia en comparación con las mujeres. Mientras que, en las mujeres posmenopáusicas, el 82% son hipertensas y este signo se asocia significativamente a la prevalencia de otros factores de riesgo cardiovascular [30].

Las diferencias en la hipertensión se deben a que, las hormonas sexuales, especialmente los estrógenos, participan en la regulación del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (RAAS, por sus siglas en inglés). Se ha demostrado que los estrógenos aumentan la síntesis de angiotensinógeno y del receptor tipo 2 para angiotensina II (Ang II), mientras disminuyen la síntesis del receptor tipo 1 para Ang II, la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ACE, por sus siglas en inglés). La acción de Ang II sobre su receptor tipo 1 se asocia con hipertensión, mientras que la unión a su receptor tipo 2 se asocia con una disminución de la presión arterial y este ejerce funciones neuromoduladoras sobre la actividad simpática [31].

La resistencia a la insulina se asocia con la alteración la glucemia en ayuno (IFG, por sus siglas en inglés) o con intolerancia a la glucosa (IGT). Estudios de prevalencia DECODE (Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis of diagnostic criteria in Europe), indican que la prevalencia de IFG es más alta en hombres que en mujeres. En contraste, la prevalencia de IGT es más alta en mujeres, excepto las mujeres en Asia arriba de 60 años y mujeres en Europa arriba de 80 años de edad [32].

Las diferencias en la regulación metabólica entre hombres y mujeres se deben a diferencias en la masa muscular, adiposidad y hormonas. Se ha demostrado un dimorfismo sexual en el metabolismo de los lípidos, metabolismo de glucosa, sensibilidad a la insulina en sus órganos blanco y en la resistencia a la insulina [33]. Sin embargo, se desconocen los efectos del dimorfismo sexual sobre el mecanismo de resistencia a la insulina.

## 6. La fisiopatología del síndrome metabólico

Los mecanismos que conducen al desarrollo del SM son complejos y aún no se establece un mecanismo común entre todos los

componentes del SM. Sin embargo, la amplia distribución del SM en todo el mundo ha dejado claro que factores ambientales como las dietas ricas en calorías y la baja actividad física han llevado al desarrollo de obesidad, la cual tiene un papel importante en la etiología del SM [34]. A continuación se describen el papel de la obesidad y la resistencia a la insulina en la fisiopatología del SM.

### 6.1. La obesidad y la inflamación

De acuerdo con la OMS, la obesidad se define como la acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud y se mide con un IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. La obesidad visceral se ha descrito como el principal factor que desencadena la resistencia a la insulina presente en el SM. La acumulación de grasa ocurre por un aumento de la gota de lípidos dentro de los adipocitos y por lo tanto, aumenta el tamaño de los adipocitos (hipertrofia) o por un aumento en la diferenciación adipogénica a partir de preadipocitos (hiperplasia) o ambos procesos [35].

El tejido adiposo es el órgano endocrino más grande del cuerpo y actúa de manera autocrina, paracrina y endocrina regulando la homeostasis metabólica. El tejido adiposo tiene tres funciones principales: *i*) participa en el metabolismo de lípidos, almacenando triacilglicérols (TAG) y liberando FFA, *ii*) realiza el catabolismo de los TAG y libera glicerol y FFA que participan en el metabolismo de la glucosa en el hígado y otros tejidos, y finalmente *iii*) los adipocitos secretan moléculas bioactivas llamadas en conjunto, adipocinas, dentro de las que se incluyen hormonas y citocinas que mantienen la homeostasis y el metabolismo del tejido adiposo [36].

La expansión del tejido adiposo, principalmente por hipertrofia en respuesta a un exceso de nutrientes, conduce a un incremento en la demanda de irrigación sanguínea en este tejido, conduciendo a hipoxia.

La hipoxia genera necrosis de los adipocitos con infiltración de células del sistema inmune y una polarización de macrófagos M2 a macrófagos M1. Además, la obesidad genera una inflamación crónica de bajo grado debido a la producción de citocinas proinflamatorias como interleucina 6 (IL-6), la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), así como mediadores protrombóticos como el inhibidor del activador de plasminógeno 1-(PAI-1). Además del incremento en adipocinas proinflamatorias y producción de leptina, existe una disminución de adiponectina, la cual es una adipocina antiinflamatoria [37].

La leptina es una adipocina producida principalmente por los adipocitos maduros, los niveles de leptina son proporcionales a la cantidad de grasa en el cuerpo. La leptina controla la ingesta y el peso corporal mediado por el hipotálamo. Durante la obesidad, ese control se pierde debido a una resistencia a la leptina [34]. Después de que la leptina se une a su receptor, activa la vía de JAK-STAT, que posteriormente activa la vía de PI3K/Akt, a través de la cual regula el metabolismo de glucosa y oxidación de lípidos [36].

La IL-6 es una citocina producida por adipocitos y células del sistema inmune. Los niveles incrementan con la obesidad y la re-

sistencia a la insulina. La IL-6 incrementa la producción de proteína C reactiva y fibrinógeno en hígado y la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, favoreciendo el desarrollo de resistencia a la insulina y la formación de placas de ateroma [34]. El TNF $\alpha$  es producido principalmente por macrófagos más que por adipocitos. La producción de TNF $\alpha$  aumenta al incrementar la masa del tejido adiposo. Los niveles plasmáticos de estas citocinas correlacionan positivamente con obesidad y resistencia a la insulina [36].

La activación del RAAS, también es un factor importante en la fisiopatología del SM. Durante la obesidad y en un estado de resistencia a la insulina, se incrementa la producción de Ang II a través de la ACE, favoreciendo la activación de RAAS [34, 38].

La Ang II es un péptido vasoactivo que regula la homeostasis de la presión sanguínea y fluidos corporales. Ang II, a través de su receptor tipo 1, activa a la oxidasa de nicotinamida dinucleótido fosfato, la cual conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Las ROS producen diferentes efectos incluyendo: la oxidación de LDL, daño endotelial, agregación de plaquetas, aumento en la expresión del factor nuclear NF- $\kappa$ B, y aumento en la expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LOX-1, por sus siglas en inglés) en células del músculo liso vascular y en células endoteliales [34]. Todos los efectos anteriores conducen a un ciclo vicioso generando inflamación, daño endotelial, proliferación de fibroblastos que llevan al desarrollo de hipertensión, dislipidemia y contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares [34].

## 6.2. La resistencia a la insulina en el síndrome metabólico

Desde que Reaven y colaboradores describieron por primera vez el SM, se propuso a la resistencia a la insulina como un factor central en la fisiopatología del SM [39], además de ser el sello distintivo de la DM2.

A la fecha se han propuesto varios mecanismos que conducen al desarrollo de resistencia a la insulina en el SM. Se sugiere que el detonante de estos mecanismos podría ser la obesidad generada por el exceso de nutrientes como las dietas hipercalóricas o bebidas azucaradas. El constante estímulo sobre las células  $\beta$  pancreáticas, hace que estas secreten más insulina y produzcan hiperinsulinemia, condición incompatible con la vida, por lo que los tejidos en nuestro organismo generan resistencia a la insulina. La hiperinsulinemia es un proceso compensatorio que responde probablemente a la hipersecreción de citocinas y se observa en etapas tempranas del SM y también se asocia con un incremento en la masa de células  $\beta$  [40] (Figura 2).

Además como se mencionó anteriormente, durante la obesidad el tejido adiposo libera adipocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-6, PAI-1, MCP-1, que generan inflamación sistémica, daño endotelial y estado protrombótico [34, 41].

En el tejido adiposo la resistencia a la insulina produce una pérdida de la inhibición de la lipólisis, lo que conduce a un exceso de FFA en plasma, estos lípidos y sus derivados como ceramidas, TAG y diacilgliceroles (DAG) se acumulan en las células produciendo lipotoxicidad y regulando de manera negativa la vía de señalización de insulina y promoviendo aún más el estado de resistencia a la insulina en músculo, hígado y tejido adiposo [34, 41].

### 6.2.1. Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina

Como se mencionó anteriormente, las acciones de la insulina sobre sus órganos blanco comienzan con la unión de la insulina a su receptor, y activación de la vía de PI3K/Akt, a través de la cual la insulina realiza acciones metabólicas y es la vía que principalmente se afecta en la resistencia a la insulina. A continuación se enlistan algunos de los mecanismos moleculares a través de los cuales se produce resistencia a la insulina.

### 6.2.2 Disminución del receptor a insulina

La señalización de insulina depende de la transducción de la señal río abajo de su receptor y también del número de receptores disponibles en la membrana. Durante la resistencia a la insulina ambos procesos pueden verse modificados.

La pérdida en la transducción de la señal puede deberse a desfosforilaciones de los residuos de tirosina del receptor a través de mecanismos que dependen de PKCs, fosfatasa de proteínas con actividad en tirosina 1B (PTP-1B) o a través de los supresores de la señalización de citocinas (SOCs). Todas estas enzimas suprimen la transducción de la señal entre el receptor e IRS1 [13].

El número de receptores disponibles en la membrana puede disminuir por una ruptura proteolítica de la parte extracelular del receptor de insulina llamada ectodominio. Esta ruptura se da después de la unión de la insulina a su receptor, así que la insulina se libera unida al ectodominio, esta parte del receptor que es liberada se conoce como receptor soluble a insulina (SIR, por sus siglas en inglés). La insulina unida al SIR ya no puede unirse a los receptores en la membrana. Por lo que el receptor soluble es un importante regulador de la cantidad de insulina libre en plasma. Nuestro grupo de trabajo demostró que los niveles de SIR son mayores en presencia de hiperinsulinemia. Además, en un modelo de SM en rata donde los animales son hiperinsulinémicos hay mayor cantidad de SIR en plasma, por lo que el SIR puede ser un mecanismo a través del cual se genera resistencia a la insulina [42].

### 6.2.3. La inhibición no regulada de nodos críticos en la vía de señalización

La inhibición no regulada de la vía de señalización de insulina se da principalmente en la fase proximal, en nodos críticos como el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1), PI3K o Akt. El IRS1 puede ser degradado por una ubiquitina ligasa reclutada a través de SOC. Además, es fosforilado en residuos inhibitorios (serina/treonina), por la cinasa N terminal c-Jun (JNK1), la cinasa del inhibidor del factor nuclear k-B (IKK-B) y PKC todas estas cinasas se activan por las vías de señalización de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , entre otras, y también los nutrientes como los FFA pueden activar JNK1 e IKK-B. Todo esto muestra cómo la obesidad, afecta la vía de señalización de insulina y genera alteraciones metabólicas [13]. Además, se ha propuesto que durante la obesidad la cinasa ribosomal S6K1, la cual participa en la vía de síntesis de proteínas, es sobreestimulada y puede fosfori-

lar a IRS1 en la serina 1101 (Ser1101) provocando la degradación del IRS1. Esto hace que la vía de señalización se vea afectada en la comunicación del receptor de insulina y el sustrato del receptor a insulina inhibiendo la transducción de señal [13].

La cinasa Akt, es un nodo crítico en la vía de señalización de insulina; se ha demostrado que la acumulación de ceramidas y DAG puede afectar la función de Akt, por estimular la actividad de PKC $\zeta$ , la cual afecta la localización de Akt en la membrana. Además, fosfatasa de proteínas como PP2A (fosfatasa de proteína 2A) y PHLPP1a (fosfatasa de proteína con dominios repetidos de leucina y dominios de homología a Pleckstrina) pueden desfosforilar a Akt afectando su actividad [13].

### 7. Dimorfismo sexual en los mecanismos de la resistencia a la insulina en el síndrome metabólico

Como se mencionó anteriormente, existe un dimorfismo sexual en la sensibilidad a la insulina y en las moléculas que participan en la vía de señalización de insulina. Recientemente nuestro grupo de trabajo realizó la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a la insulina observada en un modelo de síndrome metabólico en rata [43].

Después de seis meses de tratamiento con una solución de sacarosa al 20% en el agua de bebida, tanto ratas hembras y machos desarrollaron SM con obesidad central, hipertrigliceridemia, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. De manera interesante, nuestro modelo desarrolló dimorfismo sexual en los signos del SM. Las hembras

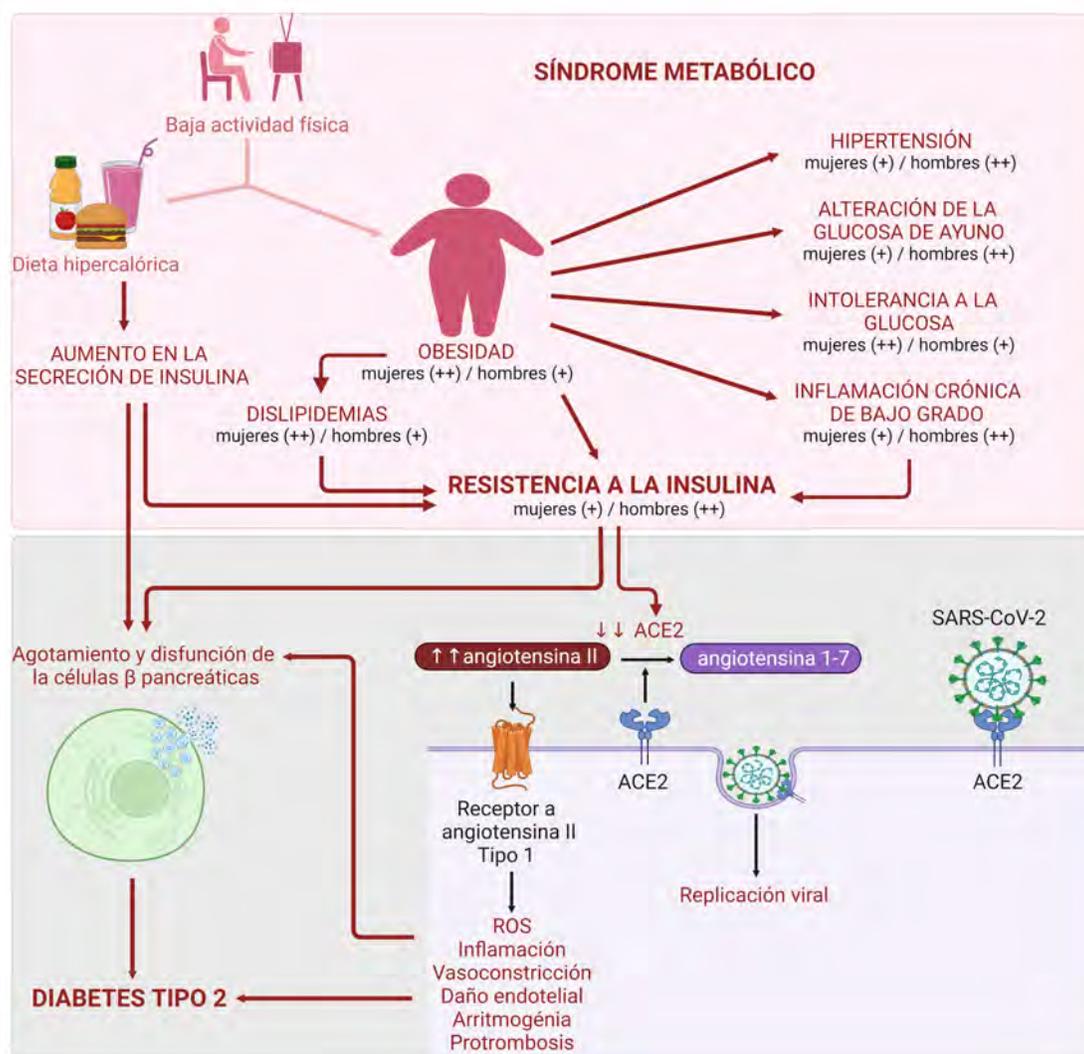


Figura 2. Fisiopatología del síndrome metabólico y el papel de la resistencia a la insulina en la severidad por SARS-CoV2. El consumo de dietas hipercalóricas y la baja actividad física contribuyen al desarrollo de obesidad, la cual juega un papel importante en la aparición de todos los signos metabólicos del SM. La resistencia a la insulina es una de las comorbilidades asociadas a la severidad en la infección por el virus SARS-CoV2. El virus que produce la enfermedad de la Covid-19 se une a su receptor ACE2 y se internaliza para su replicación viral. Lo anterior contribuye a disminuir aún más la expresión de ACE2, la cual también se encuentra disminuida en la resistencia a la insulina. La disminución de ACE2 contribuye al aumento de angiotensina II, la cual a través de su receptor desencadena procesos biológicos que son dañinos para todas las células. En células  $\beta$  pancreáticas puede contribuir a su agotamiento y disminución en la secreción de insulina. ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2; ROS: especies reactivas de oxígeno.

tratadas acumularon más grasa, presentaron mayores niveles de triacilglicérol en plasma y fueron más intolerantes a la glucosa en comparación con los machos. Mientras que los machos presentaron alteración en la glucosa de ayuno, hipertensión arterial y presentaron mayores niveles de insulina en plasma, además de que fueron menos sensibles a la insulina en comparación con las hembras [44].

Nosotros evaluamos la vía de señalización de insulina a través de la fosforilación que activa a Akt(S473) y S6K1(T389) y la fosforilación inhibitoria en IRS1(S1101) en músculo, y dos depósitos de grasa (gonadal y peripancreática). Observamos que los mecanismos moleculares a través de los cuales se produce resistencia a la insulina son diferentes entre machos y hembras y son tejido-específicos [27].

### 8. Papel de la resistencia a la insulina y la severidad de la enfermedad de Covid-19

Los estudios epidemiológicos de la reciente enfermedad de la Covid-19 han mostrado cómo los casos más severos de esta enfermedad y la mortalidad de la misma, están asociados a personas con obesidad, DM2 y resistencia a la insulina. Esta última, como lo revisamos en este capítulo, es un factor central en el desarrollo del SM y está presente en personas con DM2. Aunque la fisiopatología de la Covid-19 es compleja y no se entiende muy bien, se han establecido algunos mecanismos que puedan explicar dicha asociación [26].

En un microambiente sano la enzima ACE2 regula la presión arterial convirtiendo Ang II en Ang(1-7), lo que disminuye el estrés oxidativo, aumenta la actividad de GLUT4 y esto favorece que no haya resistencia a la insulina. En una condición de resistencia a la insulina, se pierde esta conversión por parte de ACE2 aumentando los niveles de Ang II y provocando así la activación del RAAS. Los niveles elevados de Ang II producen ROS, daño endotelial, hipertensión y disfunción cardíaca. En la Covid-19, el virus SARS-Cov2 infecta a las células huésped a través de la ACE2, disminuyendo su expresión, lo que resulta en elevados niveles de Ang II, siendo este péptido vasoactivo uno de los responsables de la severidad de la enfermedad de Covid-19 [45, 46] en pacientes con comorbilidades como la resistencia a la insulina y DM2 [47] (Figura 2).

Por otro lado, en la resistencia a la insulina aumenta la expresión de ACE2 en las células  $\beta$  del páncreas, creando mayor afinidad por la proteína espícula (*spike*) del virus SARS-Cov2 en personas con resistencia a la insulina incrementando su vulnerabilidad a la infección por Covid-19 [47].

### 9. Conclusiones

La resistencia a la insulina es una condición crítica que aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas. Durante ventanas críticas, el desarrollo se presenta la resistencia a la insulina fisiológica en respuesta a cambios en la demanda de sustratos metabólicos o la remodelación y maduración de los órganos. Sin embargo, estos cambios aumentan la probabilidad de que al-

gún desequilibrio pueda favorecer la disfunción metabólica. En contextos patológicos la resistencia a la insulina juega un papel determinante en conjunto con los signos que integran el SM y aumentan el riesgo de progresar a DM2 o enfermedades cardiovasculares.

Profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina en ambos sexos es relevante en la prevención y tratamiento del síndrome metabólico y el impacto que tiene en las pandemias de obesidad, DM2 y la Covid-19.

### Referencias

- [1] Hiriart, M., Velasco, M., Larque, C., Diaz-Garcia, C. M. Metabolic syndrome and ionic channels in pancreatic beta cells. *Vitam Horm* 2014, 95:87-114.
- [2] Aguayo-Mazzucato, C., Sanchez-Soto, C., Godinez-Puig, V., Gutierrez-Ospina, G., Hiriart, M. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS One* 2006, 1:e35.
- [3] McEwan, S., Kwon, H., Tahiri, A., Shanmugarajah, N., Cai, W., Ke, J., Huang, T., Belton, A., Singh, B., Wang, L., et al. Deconstructing the origins of sexual dimorphism in sensory modulation of pancreatic beta cells. *Mol Metab* 2021, 53:101260.
- [4] Tramunt, B., Smati, S., Grandgeorge, N., Lenfant, F., Arnal, J. F., Montagner, A., Gourdy, P. Sex differences in metabolic regulation and diabetes susceptibility. *Diabetologia* 2020, 63(3):453-461.
- [5] De Paoli, M., Zakharia, A., Werstuck, G. H. The role of estrogen in insulin resistance: A review of clinical and preclinical data. *The American journal of pathology* 2021, 191(9):1490-1498.
- [6] Samuel, V. T., Shulman, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* 2016, 126(1):12-22.
- [7] Petersen, M. C., Shulman, G. I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev* 2018, 98(4):2133-2223.
- [8] Li, J., Wang, Z., Ren, L., Fan, L., Liu, W., Jiang, Y., Lau, H. K., Liu, R., Wang, Q. Antagonistic interaction between nodal and insulin modulates pancreatic beta-cell proliferation and survival. *Cell communication and signaling : CCS* 2018, 16(1):79.
- [9] Yang, Q., Vijayakumar, A., Kahn, B. B. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018, 19(10):654-672.
- [10] Ortiz-Huidobro, R. I., Velasco, M., Larque, C., Escalona, R., Hiriart, M. Molecular insulin actions are sexually dimorphic in lipid Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021, 12:690484.
- [11] Garcia-Carrizo, F., Priego, T., Szostaczuk, N., Palou, A., Pico, C. Sexual dimorphism in the age-induced insulin resistance, liver steatosis, and adipose tissue function in rats. *Front Physiol* 2017, 8:445.
- [12] Dearden, L., Bouret, S. G., Ozanne, S. E. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. *Mol Metab* 2018, 15:8-19.
- [13] Haeusler, R. A., McGraw, T. E. Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018, 19(1):31-44.
- [14] Stenvers, D. J., Scheer F, Schrauwen P, la Fleur SE, Kalsbeek A. Circadian clocks and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 2019, 15(2):75-89.

- [15] Chen, Y., Huang, L., Qi, X., Chen, C. Insulin receptor trafficking: consequences for insulin sensitivity and diabetes. *Int J Mol Sci* 2019, 20(20).
- [16] Cabrera-Vasquez, S., Navarro-Tableros, V., Sanchez-Soto, C., Gutierrez-Ospina, G., Hiriart, M. Remodelling sympathetic innervation in rat pancreatic islets ontogeny. *BMC Dev Biol* 2009, 9:34.
- [17] Larque, C., Velasco, M., Barajas-Olmos, F., Garcia-Delgado, N., Chavez-Maldonado, J. P., Garcia-Morales, J., Orozco, L., Hiriart, M. Transcriptome landmarks of the functional maturity of rat beta-cells, from lactation to adulthood. *J Mol Endocrinol* 2016, 57(1):45-59.
- [18] Fernandez-Twinn, D. S., Alfaradhi, M. Z., Martin-Gronert, M. S., Duque-Guimaraes, D. E., Piekarz, A., Ferland-McCollough, D., Bushell, M., Ozanne, S. E. Downregulation of IRS-1 in adipose tissue of offspring of obese mice is programmed cell-autonomously through post-transcriptional mechanisms. *Mol Metab* 2014, 3(3):325-333.
- [19] Chen, X., McClusky, R., Chen, J., Beaven, S. W., Tontonoz, P., Arnold, A. P., Reue, K. The number of x chromosomes causes sex differences in adiposity in mice. *PLoS Genet* 2012, 8(5):e1002709.
- [20] Teixeira, P. D. S., Tavares, M. R., Jose, D. Temporal characterization of the insulin resistance during puberty in mice. *Endocrine regulations* 2021, 55(1):1-4.
- [21] Hannon, T. S., Janosky, J., Arslanian, S. A. Longitudinal study of physiologic insulin resistance and metabolic changes of puberty. *Pediatr Res* 2006, 60(6):759-763.
- [22] Baeyens, L., Hindi, S., Sorenson, R. L., German, M. S.  $\beta$ -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes Metab* 2016, 18 Suppl 1:63-70.
- [23] Moyce, B. L., Dolinsky, V. W. Maternal beta-Cell adaptations in pregnancy and placental signalling: implications for gestational diabetes. *Int J Mol Sci* 2018, 19(11).
- [24] Skajaa, G. O., Fuglsang, J., Knorr, S., Moller, N., Ovesen, P., Kampmann, U. Changes in insulin sensitivity and insulin secretion during pregnancy and post partum in women with gestational diabetes. *BMJ open diabetes research & care* 2020, 8(2).
- [25] Dziegielewska-Gesiak, S., Stoltny, D., Brozek, A., Muc-Wierzgon M., Wysocka E. Are insulin-resistance and oxidative stress cause or consequence of aging? *Exp Biol Med (Maywood)* 2020, 245(14):1260-1267.
- [26] Gangadharan, C., Ahluwalia, R., Sigamani, A. Diabetes and Covid-19: Role of insulin resistance as a risk factor for Covid-19 severity. *World journal of diabetes* 2021, 12(9):1550-1562.
- [27] Velasco, M., Ortiz-Huidobro, R. I., Larque, C., Sanchez-Zamora, Y. I., Romo-Yanez, J., Hiriart, M. Sexual dimorphism in insulin resistance in a metabolic syndrome rat model. *Endocrine connections* 2020, 9(9):890-902.
- [28] Grundy, S. M. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med* 2016, 26(4):364-373.
- [29] Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Mehta, J. L. Metabolic syndrome: does it differ between women and men? *Cardiovasc Drugs Ther* 2015, 29(4):329-338.
- [30] Ong, K. L., Tso, A. W., Lam, K. S., Cheung, B. M. Gender difference in blood pressure control and cardiovascular risk factors in Americans with diagnosed hypertension. *Hypertension* 2008, 51(4):1142-1148.
- [31] Hilliard, L. M., Mirabito, K. M., Denton, K. M. Unmasking the potential of the angiotensin AT2 receptor as a therapeutic target in hypertension in men and women: what we know and what we still need to find out. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2013, 40(8):542-550.
- [32] Harris, M. I., Eastman, R. C., Cowie, C. C., Flegal, K. M., Eberhardt, M. S. Comparison of diabetes diagnostic categories in the U.S. population according to the 1997 American Diabetes Association and 1980-1985 World Health Organization diagnostic criteria. *Diabetes Care* 1997, 20(12):1859-1862.
- [33] Varlamov, O., Bethea, C. L., Roberts, C. T. Jr. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014, 5:241.
- [34] Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., Mehta, J. L., Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic advances in cardiovascular disease* 2017, 11(8):215-225.
- [35] Piche, M. E., Tchernof, A., Despres, J. P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases. *Circ Res* 2020, 126(11):1477-1500.
- [36] Kumari, R., Kumar, S., Kant, R. An update on metabolic syndrome: Metabolic risk markers and adipokines in the development of metabolic syndrome. *Diabetes & metabolic syndrome* 2019, 13(4):2409-2417.
- [37] McCracken, E., Monaghan, M., Sreenivasan, S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in dermatology* 2018, 36(1):14-20.
- [38] Lanza, K., Perez, L. G., Costa, L. B., Cordeiro, T. M., Palmeira, V. A., Ribeiro, V. T., Simoes, E. S. A. C. Covid-19: the renin-angiotensin system imbalance hypothesis. *Clin Sci (Lond)* 2020, 134(11):1259-1264.
- [39] Reaven, G. M., Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988, 37(12):1595-1607.
- [40] Alejandro, E. U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Meneur, C., Bernal-Mizrachi, E. Natural history of beta-cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Mol Aspects Med* 2015, 42:19-41.
- [41] da Silva Rosa, S. C., Nayak, N., Caymo, A. M., Gordon, J. W., Mechanisms of muscle insulin resistance and the cross-talk with liver and adipose tissue. *Physiological reports* 2020, 8(19):e14607.
- [42] Hiriart, M., Sanchez-Soto, C., Diaz-Garcia, C. M., Castanares, D. T., Avitia, M., Velasco, M., Mas-Oliva, J., Macias-Silva, M., Gonzalez-Villalpando, C., Delgado-Coello, B., et al. Hyperinsulinemia is associated with increased soluble insulin receptors release from hepatocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014, 5:95.
- [43] Velasco, M., Larque, C., Gutierrez-Reyes, G., Arredondo, R., Sanchez-Soto, C., Hiriart, M. Metabolic syndrome induces changes in KATP-channels and calcium currents in pancreatic beta-cells. *Islets* 2012, 4(4):302-311.
- [44] Velasco, M., Ortiz-Huidobro, R. I., Larqué, C., Sánchez-Zamora, Y. I., Romo-Yáñez, J., Hiriart, M. Sexual dimorphism in insulin resistance in a metabolic syndrome rat model. *Endocrine connections* 2020.
- [45] Haug, G., Eapen, M. S., Sohal, S. S. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in Covid-19. *N Engl J Med* 2020, 382(24):e92.
- [46] Vaduganathan, M., Solomon, S. D. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in Covid-19. Reply. *N Engl J Med* 2020, 382(24):e92.
- [47] Govender, N., Khaliq, O. P., Moodley, J., Naicker, T. Insulin resistance in COVID-19 and diabetes. *Primary care diabetes* 2021, 15(4):629-634.

# Efecto de la palmitoil-CoA sobre la liberación de citocromo c, un proceso clave de la apoptosis de las mitocondrias del hígado de ratas con obesidad

Miguel Ángel Barrios-Maya, Angélica Ruiz-Ramírez y Mohammed El-Hafidi\*  
Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

\*Autor para correspondencia:

Mohammed El Hafidi

Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Juan Badiano No 1, Colonia Sección XVI, Tlalpan 14080, Ciudad de México, México

Tel (52) 55 73 29 11 Ext: 25304

E-mail: medelhafidi@yahoo.com

**Resumen:** El hígado graso no alcohólico (HGNA) ha sido descrito como una manifestación del síndrome metabólico (SM) el cual está caracterizado por la obesidad, resistencia a la insulina, aumento de los lípidos hepáticos y estrés oxidante. El HGNA es un trastorno metabólico caracterizado por una acumulación ectópica de lípidos en al menos 5% de los hepatocitos, generando esteatosis hepática, primera fase de la enfermedad, la cual evoluciona hacia la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la cirrosis y finalmente puede resultar en el desarrollo de cáncer hepático. Esta progresión del HGNA implica la lipotoxicidad y la muerte de los hepatocitos por apoptosis donde la liberación de citocromo c (cit-c) desde la mitocondria hacia el citosol es un proceso clave. La lipotoxicidad está asociada con la acumulación de ácidos grasos libres (AGL) tales como el ácido palmítico y su intermediario palmitoil-CoA (Pal-CoA). En un modelo de SM inducido por una dieta alta en sacarosa la concentración del ácido palmítico aumenta tanto en el hígado entero como en las mitocondrias. Sin embargo, la liberación de cit-c de las mitocondrias de animales con SM es menos sensible a sustratos oxidativos como succinato, piruvato/malato o Pal-CoA que en las mitocondrias controles, a pesar del aumento en la generación de  $H_2O_2$  por las mitocondrias de animales con SM en comparación con los controles. La disminución de la liberación de cit-c en las mitocondrias de animales con SM puede ser debido al enriquecimiento de las especies moleculares de cardiolipina (CL) con ácido palmítico lo cual hace que la CL sea más resistente a la peroxidación, un mecanismo que está implicado en la disociación de cit-c de la membrana interna mitocondrial y por lo tanto afecta el proceso apoptótico.

**Palabras clave:** Cardiolipina, Citocromo c, Lipotoxicidad, Síndrome Metabólico, Mitocondria; Palmitoil-CoA

## Abreviaturas

AGL	Ácidos grasos libres
ANT	Adenina nucleótido translocasa
ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
CL	Cardiolipina
CypD,	Ciclofilina D
CsA	Ciclosporina A
cit-c	Citocromo c
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
HGNA	Hígado graso no alcohólico
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MIM	Membrana interna mitocondrial
MEM	Membrana externa mitocondrial
Nox	NADPH-oxidasa
Pal-CoA	Palmitoil-CoA
PTPm	Poros de la transición de la permeabilidad mitocondrial
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SM	Síndrome metabólico
SOD	Superóxido dismutasa

## 1. Introducción

El hígado graso no alcohólico (HGNA) actualmente es una de las enfermedades hepáticas crónicas más comunes a nivel mundial, se estima que afecta alrededor del 20% al 30% de la población adulta, y aproximadamente del 80% al 90% de los pacientes obesos [1]. El HGNA comprende un amplio espectro clínico que va desde la esteatosis simple, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la fibrosis hepática y en algunos casos resulta en eventos más severos como el cáncer hepático [2]. La epidemia mundial de obesidad ha sido un factor clave en el aumento en la prevalencia de HGNA a nivel mundial [3]. Particularmente en Latinoamérica, se ha incrementado la incidencia de cáncer hepático relacionado con HGNA del 1.8% al 12.8% que corresponden a datos recopilados entre 2005-2006 y 2011-2012 respectivamente, lo cual representa un aumento seis veces mayor en menos de una década [4]. Además, pacientes con HGNA tienen tres veces más probabilidades de mortalidad relacionada con enfermedades hepáticas [5], mientras que el síndrome metabólico (SM) aumenta en un 70% el riesgo de muerte súbita cardíaca, cuando se conjunta con factores como el HGNA y la resistencia a la insulina [6].

El HGNA se caracteriza por una acumulación ectópica de lípidos en al menos 5% de los hepatocitos. Estos lípidos que se componen de ácidos grasos libres (AGL), triglicéridos y otros lípidos complejos como las ceramidas, se asocian con la lipotoxicidad, la inflamación y la muerte de los hepatocitos por apoptosis. Los mecanismos implicados en la lipotoxicidad incluyen el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial que juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad del HGNA a la fibrosis, la cirrosis y el carcinoma hepatocelular [7, 8]. Para investigar el papel que juega la lipotoxicidad en el desarrollo de la enfermedad de HGNA y su progresión hacia la fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma, varios modelos experimentales de animales así como de células en cultivo han sido desarrollados. Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un modelo animal de SM inducido por una dieta alta en sacarosa que se caracteriza por acumulación de grasa en la cavidad intra-abdominal y en el hígado [9].

## 2. Modelo experimental de SM

Nuestro modelo de alteración metabólica y cardiovascular [10, 11] deriva del modelo de Reaven [12]. A diferencia del modelo de Reaven que tuvo una dieta alta en sacarosa (60%) en alimentos sólidos durante seis a diez semanas, el modelo desarrollado por nuestro grupo consume una proporción menor de azúcar refinada (30%) en el agua de bebida por un período más largo, de veinte a 24 semanas. El consumo de sacarosa induce hipertrigliceridemia y un alto nivel de AGL asociado a la acumulación de grasa intra-abdominal [13]. El modelo experimental también desarrolla diferentes alteraciones metabólicas similares a las que presentan los pacientes con SM reflejando la realidad que se observa en la población mexicana, la cual ocupa el primer lugar en consumo de bebidas gaseosas con altas concentración de azúcares. El modelo experimental desarrolla resistencia a la insulina con altos niveles de marcadores de estrés oxidativo en diferentes órganos e hipertensión con alteraciones en la reactividad vascular debido a un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la actividad de la NADPH-oxidasa (Nox) [9, 14]. Por otro lado, se ha encontrado una relación directa entre los AGL y la acumulación de grasa intra-abdominal características de la lipotoxicidad [15].

## 3. Lipotoxicidad y disfunción mitocondrial en el HGNA

El papel de las mitocondrias en la progresión del HGNA a una enfermedad más grave implica el proceso apoptótico de los hepatocitos [16, 17]. Este proceso de muerte en los hepatocitos implica dos vías fundamentales: la vía extrínseca, que transmite señales a través de receptores de muerte, y la vía intrínseca, que se inicia por estímulos intracelulares. La vía extrínseca se activa mediante la unión de ligandos de la muerte a sus receptores que se encuentran en la superficie de la célula [18]. Los ligandos de muerte pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), incluyendo FasL, TNF- $\alpha$  y el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL). En consecuencia, los receptores

de muerte incluyen el Fas, el receptor 1 del TNF y el TRAIL-R [19]. La unión del ligando de muerte a su receptor hace que los dominios de muerte intracelulares se unan a ciertas proteínas adaptadoras citoplasmáticas como la proteína asociada a Fas con dominio de muerte (FADD) y activan a las caspasas iniciadoras de esta vía (como la caspasa-8). La vía intrínseca es mediada por las mitocondrias y regulada por las proteínas de la familia Bcl-2, que incluyen proteínas proapoptóticas (Bid, Bax, Bak) y proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL) que se unen a la membrana externa mitocondrial (MEM) disminuyendo su permeabilidad e inhibiendo la liberación del citocromo c en el citoplasma. La vía intrínseca se caracteriza por la liberación de (cit-c) u otros factores activadores de caspasas. Esta liberación está mediada por el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) o la oligomerización de Bax y su inserción en la MEM. El cit c en el citoplasma, participa en la formación de un complejo denominado apoptosoma que activa la caspasa-9 que a su vez activa la cascada de caspasas efectoras.

Tanto en la vía intrínseca (o mitocondrial) como en la extrínseca inducida por la unión del TNF- $\alpha$  a su receptor provocando la escisión de Bid en una forma truncada y la formación del poro Bax/Bak en la MEM, la liberación del cit-c desde las mitocondrias hacia el citosol es un paso clave en el proceso de apoptosis [20]. Para que se lleve a cabo la liberación del cit-c debe ocurrir la disociación del complejo que esta proteína forma con el fosfolípido cardioplipina (CL), un fosfolípido exclusivo de la membrana interna mitocondrial (MIM), por efecto de la oxidación del fosfolípido y la formación de un poro (de oligómeros de Bax y Bak) que permita la salida del cit-c al citosol (Figura 1). En el hígado graso, la liberación de cit-c por parte de las mitocondrias puede verse afectada por la acumulación de AGL y sus intermediarios acil-CoA [21-23]. El exceso de AGL en el HGNA, contribuye al aumento en la generación de ROS o al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa disminuyendo la síntesis de ATP y promoviendo la apoptosis [24].

En el modelo de obesidad e hígado graso inducido por una dieta alta en sacarosa, se observó que el nivel de ácido palmítico y la generación de ROS aumentó en las mitocondrias de hígado SM en comparación con las mitocondrias de controles [16, 25, 26]. El ácido palmítico afecta la función mitocondrial tanto en mitocondrias aisladas como en cultivo de células [27, 28], y su efecto está asociado a la muerte celular por apoptosis a través de diferentes mecanismos, incluyendo su activación a Pal-CoA [29]. Además, en el hígado los acil-CoA son sustratos para los peroxisomas y las mitocondrias y ambos son importantes fuentes intracelulares de ROS [30]. La beta-oxidación de Pal-CoA en condiciones fisiológicas, genera NAD/NADH y FAD/FADH<sub>2</sub> que transfieren electrones a los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial donde pueden participar en la reducción monovalente de entre 0.1 al 2% del oxígeno consumido por la mitocondria para generar anión superóxido [31]. También, varios estudios describieron el efecto del ácido palmítico en el colapso del potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y su efecto inhibitorio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria aumentando la generación de ROS [32-35]. En cuanto al

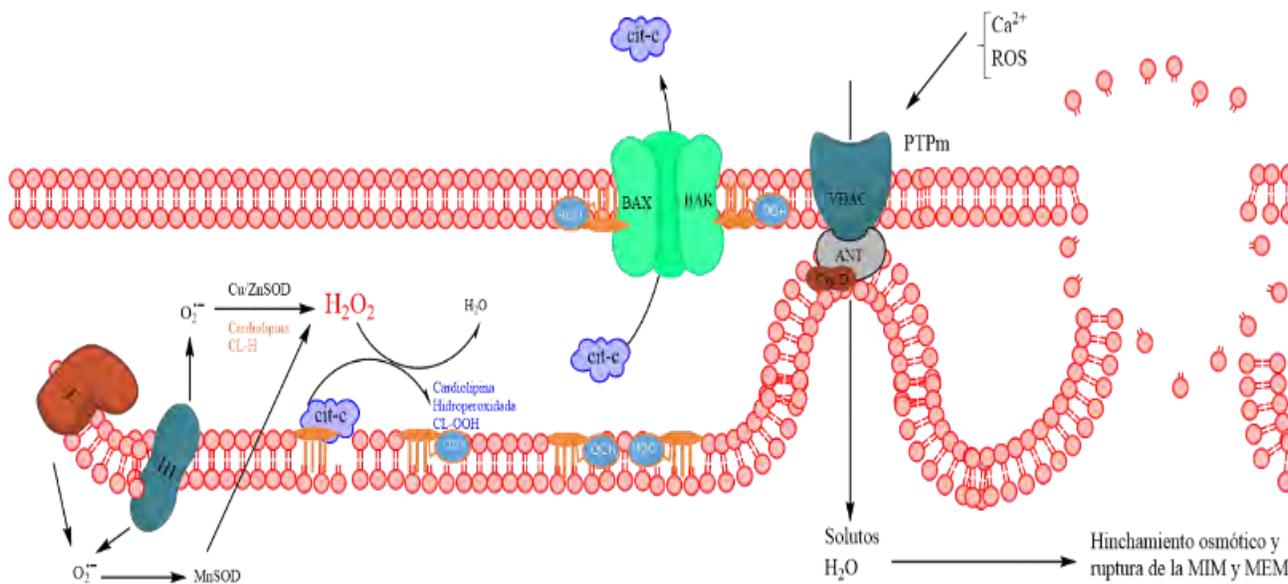


Figura 1. Mecanismos implicados en la liberación del cit-c de la mitocondria hacia el citosol para activar la vía de la apoptosis. Los dos mecanismos propuestos son: 1) la ruptura de la interacción entre el cit-c y la cardioliplina en donde las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel fundamental. 2) La salida del cit-c del espacio intermembranal hacia el citosol a través de un poro formado por la oligomerización de Bax/Bak o como consecuencia de la apertura del poro de la transición de la permeabilidad (PTPm), lo cual induce la ruptura de las membranas mitocondriales y concomitantemente la salida de las proteínas mitocondriales, incluyendo al cit-c. ANT, adenina nucleótido translocasa; CypD, ciclofilina D; CLOOH, hidroperóxido de cardioliplina; cit-c, citocromo c; LOOH, hidroperóxidos lipídicos; MIM, membrana interna mitocondrial; MEM, membrana externa mitocondrial; SOD, superóxido dismutasa. VDAC, canal aniónico dependiente de voltaje.

Pal-CoA (el intermediario del ácido palmítico activado) existen pocos informes que han descrito su efecto inhibitor sobre la adenina nucleótido translocasa (ANT), magnificando el deterioro intrínseco en la sensibilidad mitocondrial al ADP para reducir la generación de ROS en las mitocondrias del músculo esquelético de animales experimentales con dieta obesogénica [36, 37]. Por lo tanto, son escasos los reportes sobre si el Pal-CoA puede desempeñar algún papel importante en la progresión de la enfermedad hepática, desde la simple esteatosis hasta la más grave tal como la esteatohepatitis. La alta disponibilidad de ácido palmítico en el hígado graso también se asocia con un aumento de las especies de moléculas de CL, enriquecidas con ácido palmítico, sugiriendo una alta incorporación de ácido palmítico en la CL durante su síntesis de novo [25, 26]. De hecho, la peroxidación de la CL es un mecanismo propuesto para la disociación del cit-c de la membrana interna de la mitocondria [38].

#### 4. La oxidación de la cardioliplina y la actividad peroxidasa del cit-c

La CL es un fosfolípido de carácter aniónico que se encuentra casi exclusivamente en la membrana mitocondrial interna, y que no sólo estabiliza la estructura y la función de los componentes individuales de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, sino que regula procesos mitocondriales relevantes, como la dinámica mitocondrial y el mantenimiento de la estructura de las crestas, entre otros [39, 40]. Las alteraciones de la CL debidas a la

peroxidación se correlacionan con la pérdida de varias actividades mitocondriales y la progresión de la enfermedad. La CL contiene principalmente el tetra-linoleoil-CL insaturado, que comprende aproximadamente el 80% de las especies de cardioliplinas tanto en el hígado como en el músculo esquelético y el cardíaco [26]; dicha composición es óptima para el funcionamiento eficaz de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la generación de ATP. Sin embargo, el ácido linoleico es un ácido graso muy susceptible a la peroxidación en presencia de ROS.

El cit-c forma un complejo con la CL (CL—cit-c) y adquiere actividad de peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Esta interacción requiere una relación umbral del complejo CL—cit-c de 5:1 [41]. Además, la composición de ácidos grasos de las especies de CL puede influir en la unión y el desdoblamiento del cit-c, y en la subsiguiente actividad del complejo CL—cit-c. El tetra-oleoil-CL promueve la actividad peroxidasa del cit-c sólo en presencia de  $H_2O_2$ , mientras que el tetra-linoleoil-CL promueve esta actividad en ausencia de  $H_2O_2$ , probablemente debido a los hidroperóxidos lipídicos preexistentes (LOOH) [42]. La actividad peroxidasa del cit-c en las primeras etapas de la apoptosis también depende de la naturaleza del reordenamiento estructural cerca del grupo hemo del cit-c. Así, los residuos de lisina en el sitio activo regulan la interacción con la cardioliplina y optimizan la actividad peroxidasa del complejo CL—cit-c [43]. Existen pocos datos sobre el efecto de los ácidos grasos saturados de la CL sobre la actividad peroxidasa del complejo CL—cit-c. Se ha descrito que la liberación de cit-c se reduce en las mitocondrias que contienen especies de CL enriquecida en ácido palmítico en

lugar de especies de CL enriquecida en ácido linoleico, a pesar de una mayor generación de  $H_2O_2$  [44]. Este trabajo sugiere que la saturación de ácidos grasos en la CL reduce su susceptibilidad a la oxidación y, a su vez, la disociación del cit-c de la membrana interna mitocondrial.

### 5. Efecto del ácido palmítico y Pal-CoA sobre la función mitocondrial

El aumento de la concentración del ácido palmítico en el hígado de ratas con SM es un marcador de alta actividad lipogénica debido a un mayor metabolismo de la glucosa hacia la biosíntesis de ácidos grasos [45]. Sin embargo, este aumento en la concentración del ácido palmítico tanto en el homogeneizado de hígado como en las mitocondrias de ratas con SM no está asociado con la función de las mitocondrias [23]. De hecho, no hay diferencias significativas en el consumo de  $O_2$  y el control respiratorio entre las mitocondrias control y con SM en condiciones basales u oxidando succinato o glutamato/malato. Sin embargo, cuando el ácido palmítico exógeno y el Pal-CoA se añaden a las mitocondrias a la misma concentración (10  $\mu M$ ), actúan de forma diferente sobre el consumo de oxígeno mitocondrial [23]. A diferencia del ácido palmítico, el Pal-CoA inhibe el consumo de oxígeno en el estado III oxidando el succinato tanto en las mitocondrias controles como en las de SM, probablemente debido a su efecto inhibitorio sobre la actividad del ANT [37], mientras que el ácido palmítico estimula el consumo de oxígeno en el estado IV sólo en las mitocondrias del modelo de SM, probablemente, debido a su efecto desacoplante sobre la fosforilación oxidativa. El Pal-CoA también interfiere en el transporte de electrones agotando el cit-c de las mitocondrias, interrumpiendo así el flujo de electrones del complejo III al complejo IV e inhibiendo la biosíntesis de ATP, tal y como se ha descrito para las mitocondrias de corazón y de cerebro de rata [46, 47]. El Pal-CoA también aumenta la liberación de cit-c de las mitocondrias de los animales control y con SM en comparación con el succinato. Sin embargo, la liberación de cit-c en presencia de succinato o Pal-CoA sigue siendo menor en las mitocondrias con SM con respecto a las controles, a pesar del aumento de la generación de  $H_2O_2$  en las mitocondrias con SM inducido por Pal-CoA o succinato [23]. Las mitocondrias del hígado de ratas con SM generan  $H_2O_2$  a una tasa mayor que su correspondiente control cuando oxidan succinato o piruvato/malato [26]. Sin embargo, el Pal-CoA aumenta la generación de  $H_2O_2$  mucho más que cuando las mitocondrias son energizadas con succinato, tanto en mitocondrias controles como del modelo de SM [23]. La generación exacerbada de  $H_2O_2$  por el Pal-CoA se debe probablemente a la presencia de restos de peroxisomas en las preparaciones de mitocondrias que pueden participar en la generación de  $H_2O_2$  durante la beta-oxidación parcial del Pal-CoA por la Pal-CoA oxidasa como se ha descrito en otros trabajos [48, 49]. De hecho, la generación de  $H_2O_2$  en mitocondrias por Pal-CoA es sensible a la actividad de la catalasa y a la tioridazina, un inhibidor de la Pal-CoA oxidasa peroxisomal. Estas observaciones sugieren que trazas de peroxisomas presentes en la preparación de las mitocondrias pueden contribuir al aumen-

to en las concentraciones de  $H_2O_2$  liberado por las mitocondrias inducido por Pal-CoA y puede participar en el aumento del cit-c liberado por las mitocondrias. Sin embargo, la liberación de cit-c desde las mitocondrias con SM no se previene con catalasa ni con tioridazina, lo que indica que la liberación de cit-c inducida por Pal-CoA no está asociada a la generación de ROS externas desde el peroxisoma [23].

### 6. Pal-CoA y la transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial

La transición de la permeabilidad mitocondrial (mMPT) y la liberación de cit-c del espacio intermembranal de la mitocondria son características importantes que definen el proceso apoptótico. La mMPT es el resultado de la apertura de un poro que comunica el citoplasma directamente con la matriz mitocondrial. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) es una estructura que está formada por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), ubicado en la membrana externa mitocondrial, el ANT en la membrana interna, la ciclofilina D (CypD), sensible a ciclosporina A (CsA) en la matriz mitocondrial, y por la F1FoAT-Pasa que puede coincidir con el PTPm [50]. El PTPm se induce por un aumento intra-mitocondrial del calcio ( $Ca^{2+}$ ) así como las ROS. Las aperturas transitorias del poro liberan el exceso del  $Ca^{2+}$  que se acumula en la mitocondria; sin embargo, las aperturas prolongadas pueden inducir hinchamiento de la mitocondria por una entrada masiva de agua lo que conlleva a la ruptura de la membrana externa mitocondrial y la muerte celular.

La liberación de cit-c inducida por Pal-CoA es sensible a la CsA, lo que sugiere la participación del mecanismo de la apertura del PTPm [23]. Durante mucho tiempo, se ha descrito que los AGL inducen la apertura del PTPm por su efecto protonóforo y desacoplante con la disminución de la síntesis de ATP mitocondrial [48, 49]. Sin embargo, el Pal-CoA no ejerce dicho efecto de desacoplamiento protonóforo en las mitocondrias, pero tiene la característica de funcionar como inhibidor del ANT, un elemento importante de la apertura del PTPm [36, 37]. La baja capacidad de retención de  $Ca^{2+}$  (CRC) de las mitocondrias con SM refleja la sensibilidad de éstas a la apertura del PTPm inducida por  $Ca^{2+}$ . En presencia de Pal-CoA, la cantidad umbral de  $Ca^{2+}$  necesaria para inducir la apertura mPTP se encuentra más baja y se observa un colapso de la CRC de las mitocondrias con ambas concentraciones utilizadas (5 y 10  $\mu M$ ) [23]. Estos efectos son prevenidos por CsA y no por ADP, indicando que la inhibición de ANT por Pal-CoA puede prevenir el efecto de ADP para restaurar el CRC de las mitocondrias controles y de SM. La apertura del mPTP inducida por el Pal-CoA en las mitocondrias también puede estar mediada por la generación exacerbada de  $H_2O_2$  inducida por el Pal-CoA. De hecho, se ha observado que las ROS están implicadas en la oxidación de los grupos tioles de las proteínas de membrana, como la cisteína160 (Cys160) del ANT, que está cerca del sitio de unión del nucleótido de adenina y cuya oxidación suprime la capacidad del ADP para inhibir la apertura del PTPm [51, 52]. Sin embargo, la apertura del poro en ambas mitocondrias no se ve impedida por la catalasa ni por la tioridazina, que impiden la generación de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimulada por el Pal-CoA en ambos tipos de mitocondrias [23]. Estas observaciones sugieren que la apertura del PTP causada por el Pal-CoA no implica la generación externa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que el Pal-CoA puede actuar probablemente inhibiendo la actividad de ANT o por su interacción con la membrana lipídica mitocondrial. De hecho, ANT interactúa con la CypD, una proteína de la matriz mitocondrial que forma parte del mPTP que es sensible al péptido inhibidor CysA al unirse a la CypD [53]. La susceptibilidad de las mitocondrias a la transición de permeabilidad inducida por el Ca<sup>2+</sup> está también asociada con cambios en los niveles de expresión de CypD, del ANT así como de VDAC que son los principales componentes del PTPm [54, 55]. Por lo tanto, la falta de diferencia encontrada en la expresión de CypD, ANT o de VDAC sugiere que la diferencia en la susceptibilidad a la apertura

del PTPm inducida por Ca<sup>2+</sup> entre las mitocondrias control y SM no está relacionada con la expresión de las proteínas reguladoras del poro [23]. Se ha descrito que el Pal-CoA interactúa superficialmente con la membrana al unirse al cit-c [56]. Sin embargo, debido a la parte hidrofílica de la CoA, no puede difundirse a través de la membrana interna. Además, por la parte hidrofóbica saturada, puede insertarse en la membrana lipídica induciendo cambios en sus propiedades físicas que influyen en la actividad de los complejos respiratorios [57] y probablemente en la liberación del cit-c. Así, el Pal-CoA al aumentar la liberación de cit-c de las mitocondrias del modelo de SM, puede participar en el progreso de la esteatohepatitis hacia una enfermedad más grave, como la esteatohepatitis, por un mecanismo que implica la liberación de cit-c y la apertura del PTPm.

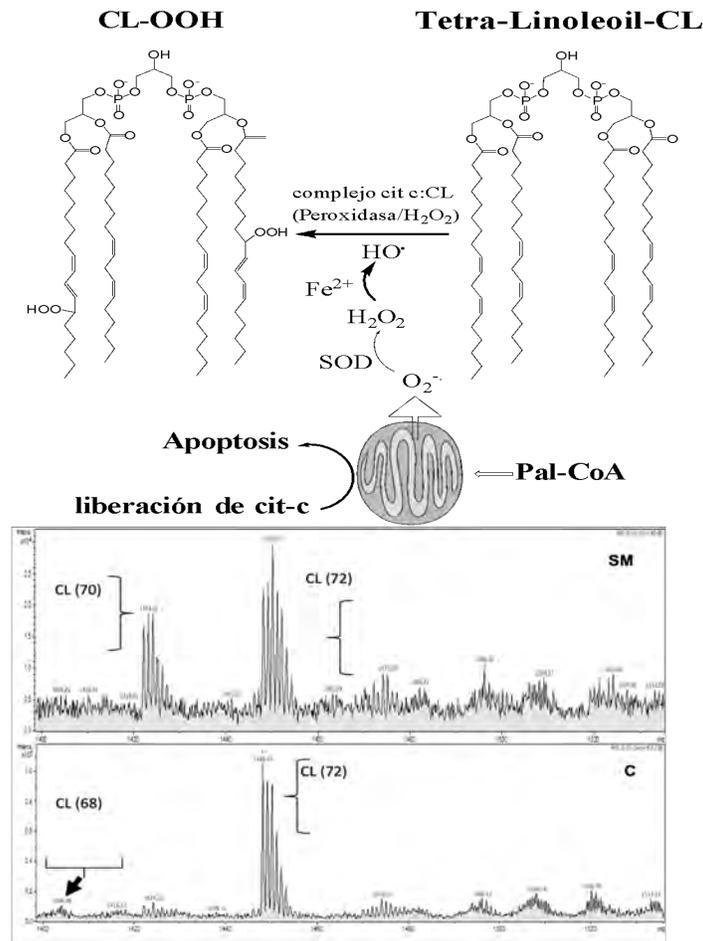


Figura 2. Oxidación de cardiolipina (CL), liberación de citocromo c y espectrometría de masas. El anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) generado en el complejo mitocondrial I o III es convertido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la superóxido dismutasa (SOD). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es reducido a radical hidroxilo (HO·) por el Fe<sup>2+</sup> según la reacción de Haber Weiss. El HO· inicia la peroxidación de CL y la generación de hidroperóxido de CL (CL-OOH). Los espectros de masa corresponden a la CL de mitocondria C y SM. Los grupos de iones a m/z: 1426, 1448 y 1472 corresponden a especies de CL que contienen, respectivamente, (C70), (C72) y (C74). (C70), (C72) y (C74) que representan el número total de carbonos relacionados con cuatro ácidos grasos de CL. El clúster (C72)CL (m/z:1448) corresponde a diferentes especies de CL que contienen cuatro ácidos linoleicos (C18:2)4CL. El clúster (C70)CL (m/z:1425.5) corresponde a (C18:2)3(C16:0)CL donde el ácido linoleico está sustituido por un ácido palmítico. El grupo 1472 corresponde a la sustitución de un ácido linoleico por un ácido araquidónico (18:2)3(C20:4)CL.

## 7. Pal-CoA y cardiolípidina

La disminución de la liberación de cit-c por las mitocondrias del modelo de SM en comparación con las mitocondrias controles, ambas bajo el efecto de Pal-CoA, puede estar relacionada con la composición lipídica de la CL. En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cit-c adquiere actividad de peroxidasa, oxidando así la CL y rompiendo las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, y por consecuencia la disociación del cit-c de la membrana lipídica [58, 59]. La interacción entre la CL y el cit-c parece depender de la composición de ácidos grasos de la CL, principalmente compuesta por ácido linoleico poliinsaturado en condiciones fisiológicas [59]. En este estudio, el análisis por espectrometría de masas sugiere un enriquecimiento de la CL con ácido palmítico y oleico en las mitocondrias del hígado del modelo con SM que lo hace menos susceptible a la peroxidación, lo que puede reflejarse en una disminución de la liberación del cit-c en las mitocondrias del modelo con SM, como se ha descrito previamente [60]. De hecho, los hidroperóxidos de CL o sus correspondientes hidroxilos que son productos de la oxidación de la CL o que se identificarían en los clústeres m/z: 1482, 1466 y 1522 y 1506 correspondientes a (C74-OOH)CL, (C74-OH)CL (C76-OOH)CL y (C76-OH)CL respectivamente, no se detectan claramente en el espectro de masa (Figura 2). Estas observaciones sugieren que el enriquecimiento de la CL con ácido palmítico, debido a su alta disponibilidad en el hígado con SM, la hace más resistente a la oxidación a pesar de la excesiva generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducida por el Pal-CoA. Además, los productos de oxidación de la CL que resultan de la actividad de peroxidasa de cit-c, están implicados en la oligomerización de Bax/Bak para formar un poro en la membrana externa de la mitocondria a través del cual el cit-c se libera de la mitocondria al citosol [61, 62].

En resumen, la liberación de cit-c inducido por Pal-CoA tanto en mitocondrias del modelo de SM como en las controles puede atribuirse a la inducción del PTPm debido a la sensibilidad a la CsA en las mitocondrias con SM. Además, los resultados sugieren la interacción directa de Pal-CoA con la membrana mitocondrial y con las proteínas relacionadas con el PTPm. Sin embargo, la disminución de la liberación de cit-c de las mitocondrias con SM, puede atribuirse a cambios en la composición de las especies moleculares de cardiolípidina. A pesar de la reducción de la liberación de cit-c en las mitocondrias del modelo de con SM, el aumento significativo de la liberación de cit-c inducido por el Pal-CoA en ambos tipos de mitocondrias sugiere que el Pal-CoA puede contribuir a la muerte celular por apoptosis por medio de cambio en la función mitocondrial.

## 8. Conclusiones

Por último, nuestro trabajo nos permite proponer que el Pal-CoA generado por la acumulación del ácido palmítico y una mayor actividad lipogénica en el hígado de los animales con la dieta alta en carbohidratos puede contribuir a la progresión de la enfermedad del hígado graso a enfermedades más graves por un mecanismo que implica la función mitocondrial y la apoptosis en el tejido hepático.

## Referencias

- [1] Patell, R., Dosi, R., Joshi, H., Sheth, S., Shah, P., and Jandawala, S. (2014). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Obesity. *J. Clin. Diagn. Res.* 8(1), 62–66. doi:10.7860/JCDR/2014/6691.3953
- [2] Marchesini, G., Day, C. P., Dufour, J.-F., Canbay, A., Nobili, V., Ratzl, V., Tilg, H., Roden, M., Gastaldelli, A., Yki-Järvinen, H., Schick, F., Vettor, R., Frühbeck, G., Mathus-Vliegen, L. and EASL. (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 64, 1388–1402. doi:10.1016/j.jhep.2015.11.004.
- [3] Polyzos, S. A., Kountouras, J. and Mantzoros, C. S. (2019) Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*, 92, 82-97, doi:10.1016/j.metabol.2018.11.014.
- [4] Piñero, F., Costa, P., Boteon, Y. L., Duque, S. H., Marciano, S., Anders, M., Varón, A., Zerega, A., Poniachik, J., Soza, A. O., Padilla-Machaca, M., Menéndez, J., Zapata, R., Vilatoba, M., Muñoz, L., Maraschio, M., Podestá, L. G., McCormack, L., Gadano, A., Boin, I.S.F.F., García, P., Silva, M.; Latin American Liver Research, Education, Awareness Network (LALREAN). (2018) A changing etiologic scenario in liver transplantation for hepatocellular carcinoma in a multicenter cohort study from Latin America. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 42(5), 443-452, doi: 10.1016/j.clinre.2018.03.014.
- [5] Minxuan, X., Sun, Y., Dai, X., Zhan, J., Long, T., Xiong, M., Li, H., Kuang, Q., Tang, T., Qin, Y., Chenxu, G. and Jun, T. (2019). Fisetin attenuates high fat diet-triggered hepatic lipid accumulation: A mechanism involving liver inflammation overload associated TACE/TNF- $\alpha$  pathway. *J Funct Foods* 53, 7-21, doi: 10.1016/j.jff.2018.12.007
- [6] Hess, P. L., Al-Khalidi, H. R., Friedman, D. J., Mulder, H., Kucharska-Newton, A., Rosamond, W. R., Lopes, R. D., Gersh, B. J., Mark, D. B., Curtis, L. H., Post, W. S., Prineas, R. J., Sotoodena, N. and Al-Khatib, S. M. (2017). The Metabolic Syndrome and Risk of Sudden Cardiac Death: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J Am Heart Assoc.* 6(8), e006103. doi:10.1161/JAHA.117.006103
- [7] Geng, Y., Faber, K. N., de Meijer, V. E., Blokzijl, H., Moshage, H., 2021. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? *Hepatol. Int.* 15(1), 21–35. <https://doi.org/10.1007/s12072-020-10121-2>
- [8] Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., Sanyal, A.J., 2018. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 24(7), 908–922. doi:10.1038/s41591-018-0104-9
- [9] El-Hafidi M, Franco M, Ramírez AR, et al. Glycine Increases Insulin Sensitivity and Glutathione Biosynthesis and Protects against Oxidative Stress in a Model of Sucrose-Induced Insulin Resistance. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:2101562. Published 2018 Feb 21. doi:10.1155/2018/2101562,
- [10] Baños G, Carvajal K, Cardoso G, Zamora J, Franco M. (1997) Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens.*;10(4 Pt 1), 379-388. doi:10.1016/s0895-7061(96)00400-1

- [11] El Hafidi M, Baños G. (1997) *In vivo* plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension*. 30(3 Pt 2):624-628. doi:10.1161/01.hyp.30.3.624
- [12] Reaven GM, Ho H: Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens* 1991; 4:610-614.
- [13] El Hafidi M, Pérez I, Zamora J, Soto V, Carvajal-Sandoval G, Baños G. (2004) Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287(6), R1387-R1393. doi:10.1152/ajpregu.00159.2004
- [14] El Hafidi M, Valdez R, Baños G. (2000). Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets, and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin Exp Hypertens*. 2000;22(1):99-108.
- [15] Ruiz-Ramírez A, Ortiz-Balderas E, Cardozo-Saldaña G, Diaz-Diaz E, El-Hafidi M. (2014) Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clin Sci (Lond)*. 126(1), 19-29. doi:10.1042/CS20130164
- [16] Kanda, T., Matsuoka, S., Yamazaki, M., Shibata, T., Nirei, K., Takahashi, H., Kaneko, T., Fujisawa, M., Higuchi, T., Nakamura, H., Matsumoto, N., Yamagami, H., Ogawa, M., Imazu, H., Kuroda, K., Moriyama, M. (2018) Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World J Gastroenterol*, 24(25), 2661-2672. doi: 10.3748/wjg.v24.i25.2661
- [17] Léveillé, M., Estall, J. L., (2019). Mitochondrial dysfunction in the transition from NASH to HCC. *Metabolites*, 9(10), 233. <https://doi.org/10.3390/metabo9100233>
- [18] Cao, L., Quan, X. B., Zeng, W. J., Yang, X. O., Wang, M. J. (2016). Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *Journal of cell death*, 9, 19-29. <https://doi.org/10.4137/JCD.S3982419>.
- [19] Yin, X. M., Ding, W. X. (2003). Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Current molecular medicine*, 3(6), 491-508. <https://doi.org/10.2174/1566524033479555>
- [20] Lemasters, J. J., Theruvath, T. P., Zhong, Z., Nieminen, A L., (2009) Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim. Biophys. Acta*. 1787(11), 1395-1401. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.06.009
- [21] Farrell, G. C., Haczeyni, F., Chitturi, S., (2018) Pathogenesis of NASH: How Metabolic Complications of Overnutrition Favour Lipotoxicity and Pro-Inflammatory Fatty Liver Disease. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1061, 19-44. doi: 10.1007/978-981-10-8684-7\_3
- [22] El Hafidi, M., Buelna-Chontal, M., Sánchez-Muñoz, F., Carbó, R., (2019) Adipogenesis: A necessary but harmful strategy. *Int. J. Mol. Sci*. 20(15), 3657. doi: 10.3390/ijms20153657
- [23] Barrios-Maya MA, Ruiz-Ramírez A, Quezada H, Céspedes Acuña CL, El-Hafidi M. (2021). Palmitoyl-CoA effect on cytochrome c release, a key process of apoptosis, from liver mitochondria of rat with sucrose diet-induced obesity. *Food Chem Toxicol*. 154, 112351. doi:10.1016/j.fct.2021.112351
- [24] Buzzetti, E., Pinzani, M., Tsochatzis, E. A. (2016) The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 65(8), 1038-1048. doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.012
- [25] Ruiz-Ramírez, A., Barrios-Maya, M., Quezada-Pablo, H., López-Acosta, O., El-Hafidi, M., (2020) Kidney dysfunction induced by a sucrose-rich diet in rat involves mitochondria ROS generation, cardiolipin changes, and the decline of autophagy protein markers. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. 318(1), F53-F66. doi: 10.1152/ajprenal.00208.2019
- [26] Ruiz-Ramírez, A., Barrios-Maya, M. A., López-Acosta, O., Molina-Ortiz, D., El-Hafidi, M., (2015) Cytochrome c release from rat liver mitochondria is compromised by increased saturated cardiolipin species induced by sucrose feeding. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 309(9), E777-E786. doi: 10.1152/ajpendo.00617.2014
- [27] Penzo, D., Tagliapietra, C., Colonna, R., Petronilli, V., Bernardi, P. (2002) Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death. *Biochim. Biophys. Acta*, 1555(1-3), 160-165. doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00272-4
- [28] Sparagna, G. C., Hickson-Bick, D. L., Buja, L. M., McMillin, J.B., (2000) A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol*. 279(5), H2124-H2132. doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.5.H2124
- [29] Seeßle, J., Liebisch, G., Schmitz, G., Stremmel, W., Chamulitrat, W., (2015) Palmitate activation by fatty acid transport protein 4 as a model system for hepatocellular apoptosis and steatosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1851(5), 549-565. doi: 10.1016/j.bbali.2015.01.004
- [30] Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., Griendling, K. K., (2018) Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ. Res*. 122(6), 877-902. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311401
- [31] Speijer, D., Manjeri, G. R., Szklarczyk, R., (2014) How to deal with oxygen radicals stemming from mitochondrial fatty acid oxidation. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 369(1646), 20130446. doi: 10.1098/rstb.2013.0446
- [32] Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K., Kaneko, S., (2009) Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J. Biol. Chem*. 284(22), 14809-14818. doi: 10.1074/jbc.M901488200
- [33] Chen, X., Li, L., Liu, X., Luo, R., Liao, G., Li, L., Liu, J., Cheng, J., Lu, Y., Chen, Y., (2018) Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci*. 203, 291-304. doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.022
- [34] Alnahdi, A., John, A., Raza, H., (2019) Augmentation of glucotoxicity, oxidative stress, apoptosis and mitochondrial dysfunction in hepg2 cells by palmitic acid. *Nutrients*, 11(9), 1979. doi: 10.3390/nu11091979.
- [35] Chen, Z., Tian, R., She, Z., Cai, J., Li, H., (2020) Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 152, 116-141. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025
- [36] Miotto, P. M., LeBlanc, P. J., Holloway, G. P., (2018) High-Fat Diet Causes Mitochondrial Dysfunction as a Result of Impaired ADP Sensitivity. *Diabetes* 67(11), 2199-2205. doi: 10.2337/db18-0417
- [37] Ciapaite, J., Bakker, S. J., Diamant, M., van Eikenhorst, G., Heine, R. J., Westerhoff, H. V., Krab, K., (2006) Metabolic control of mitochondrial properties by adenine nucleotide translocator

determines palmitoyl-CoA effects. Implications for a mechanism linking obesity and type 2 diabetes. *FEBS J.* 273(23), 5288–5302. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05523.x

[38] El-Hafidi M, Correa F, Zazueta C. (2020). Mitochondrial dysfunction in metabolic and cardiovascular diseases associated with cardiolipin remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1866(6), 165744. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165744.

[39] Ikon, N., Ryan, R. O. (2017). Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1859(6), 1156–1163. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.013>

[40] Gasanoff, E. S., Yaguzhinsky, L. S., arab, G. (2021). Cardiolipin, Non-Bilayer Structures and Mitochondrial Bioenergetics: Relevance to Cardiovascular Disease. *Cells*, 10(7), 1721. <https://doi.org/10.3390/cells10071721>

[41] Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., Petrosillo, G., (2019) Role of cardiolipin in mitochondrial function and dynamics in health and disease: Molecular and pharmacological aspects, *Cells*, 8 (2019) pii: E728. doi: 10.3390/cells8070728.

[42] Renne, M. F., Bao, X., De Smet, C. H., de Kroon, A., (2016) Lipid acyl chain remodeling in yeast. *Lipid Insights*, 8 (2016), 33–40. doi: 10.4137/LPI.S31780.

[43] Tyurina, Y. Y., Lou, W., Qu, F., Tyurin, V. A., Mohammadyani, D., Liu, J., Hüttemann, M., Frasso, M. A., Wipf, P., Bayir, H., Greenberg, M. L., Kagan, V. E., (2017) Lipidomics characterization of biosynthetic and remodeling pathways of cardiolipins in genetically and nutritionally manipulated yeast cells. *ACS Chem Biol.* 12 (2017), 265–281. doi: 10.1021/acscchembio.6b00995.

[44] Bazán, S., Mileyskovskaya, E., Mallampalli, V. K., Heacock, P., Sparagna, G. C., Dowhan, W., (2013) Cardiolipin-dependent reconstitution of respiratory supercomplexes from purified *Saccharomyces cerevisiae* complexes III and IV, *J. Biol. Chem.* 288, 401–411. doi: 10.1074/jbc.M112.425876.

[45] Tuvdendorj, D., Zhang, X. J., Chinkes, D. L., Wang, L., Wu, Z., Rodriguez, N. A., Herndon, D. N., Wolfe, R. R., (2015) Triglycerides produced in the livers of fasting rabbits are predominantly stored as opposed to secreted into the plasma. *Metabolism* 64(5), 580–587. doi: 10.1016/j.metabol.2015.01.002

[46] Schönfeld, P., Wojtczak, L., (2008) Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 45(3), 231–241. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.029

[47] Kushnareva, Y., Murphy, A.N., Andreyev, A., (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J.* 368(Pt 2), 545–553. doi: 10.1042/BJ20021121

[48] Schönfeld, P., Dymkowska, D., Wojtczak, L., (2009) Acyl-CoA-induced generation of reactive oxygen species in mitochondrial preparations is due to the presence of peroxisomes. *Free Radic. Biol. Med.* 47(5), 503–509. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.006

[49] Schönfeld, P., Wieckowski, M. R., Lebidzińska, M., Wojtczak, L., (2010). Mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative stress: lack of reverse electron transfer-associated production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 1797(6-7), 929–938. doi: 10.1016/j.bbabis.2010.01.010

[50] Nesci S. The mitochondrial permeability transition pore in cell death: A promising drug binding bioarchitecture. *Med Res Rev.* 2020;40(2):811–817. doi:10.1002/med.21635

[51] McStay, G. P., Clarke, S. J., Halestrap, A. P., (2002) Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem. J.* 367(Pt 2), 541–548. doi: 10.1042/BJ20011672

[52] Stewart, J. M., Blakely, J. A., Johnson, M. D., (2000) The interaction of ferrocytochrome c with long-chain fatty acids and their CoA and carnitine esters. *Biochem. Cell Biol.* 78(6), 675–681.

[53] Mishra, J., Davani, A. J., Natarajan, G. K., Kwok, W. M., Stowe, D. F., Camara, A. (2019) Cyclosporin A Increases Mitochondrial Buffering of Calcium: An Additional Mechanism in Delaying Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening. *Cells* 8(9), 1052. doi: 10.3390/cells8091052

[54] Li, Y., Johnson, N., Capano, M., Edwards, M., Crompton, M., (2004) Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochem J.* 383(Pt 1), 101–109. doi: 10.1042/BJ20040669

[55] Lee, J., Schriener, S. E., Wallace, D. C., (2009) Adenine nucleotide translocator 1 deficiency increases resistance of mouse brain and neurons to excitotoxic insults. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787(5), 364–370. doi: 10.1016/j.bbabis.2009.01.014

[56] Stewart, J. M., Blakely, J. A., Johnson, M. D., (2000). The interaction of ferrocytochrome c with long-chain fatty acids and their CoA and carnitine esters. *Biochem Cell Biol.* 78(6), 675–681.

[57] Oberhauser, L., Granziera, S., Colom, A., Goujon, A., Lavalard, V., Matile, S., Roux, A., Brun, T., Maechler, P., (2020) Palmitate and oleate modify membrane fluidity and kinase activities of INS-1E  $\beta$ -cells alongside altered metabolism-secretion coupling. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res.* 1867(2), 118619. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118619

[58] Mandal, A., Hoop, C. L., DeLucia, M., Kodali, R., Kagan, V. E., Ahn, J., van der Wel, P. C., (2015) Structural changes and proapoptotic peroxidase activity of cardiolipin-bound mitochondrial cytochrome c. *Biophys. J.* 109(9), 1873–1884. doi: 10.1016/j.bpj.2015.09.016

[59] Jiang, J., Huang, Z., Zhao, Q., Feng, W., Belikova, N. A., & Kagan, V. E. (2008) Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368(1), 145–150. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.055

[60] Ruiz-Ramírez, A., Chávez-Salgado, M., Peñeda-Flores, J. A., Zapata, E., Masso, F., El-Hafidi, M., (2011) High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301(6), E1198–E1207. doi: 10.1152/ajpendo.00631.2010

[61] Kagan, V. E., Chu, C. T., Tyurina, Y. Y., Cheikhi, A., Bayir, H., (2014) Cardiolipin asymmetry, oxidation and signaling. *Chem. Phys. Lipids.* 179, 64–69. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2013.11.010

[62] Barayeu, U., Lange, M., Méndez, L., Arnhold, J., Shadyro, O. I., Fedorova, M., Flemmig, J., (2019) Cytochrome c autocatalyzed carbonylation in the presence of hydrogen peroxide and cardiolipins. *J. Biol. Chem.* 294(6), 1816–1830. doi: 10.1074/jbc.RA118.004110

# **Proteínas y receptores intracelulares en la respuesta inmune y la inflamación**



# Las miosinas de clase 1 en los leucocitos y su importancia en la respuesta inmunológica

Leopoldo Santos Argumedo

Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav-IPN

**Resumen:** Las miosinas son una familia de proteínas motoras que se encuentran ampliamente distribuidas en una gran gama de células eucariotas. Su papel en la contracción muscular y en la motilidad ha sido muy estudiado. Aunque estas proteínas han sido caracterizadas extensivamente, y se conoce mucho sobre su función, poco se sabe de estas moléculas en las células hematopoyéticas. Las miosinas expresadas por las células de la respuesta inmunológica participan en mantener la tensión de la membrana plasmática, en el transporte de vesículas secretoras, en los procesos de endo- y exocitosis, y en promover la adherencia y la motilidad de las células. En los últimos años, se ha despertado un gran interés por entender la función de las miosinas de clase 1 en los leucocitos, con un especial énfasis en el papel emergente que tienen estos motores moleculares en las funciones de activación y regulación de la respuesta inmunológica.

## Abreviaturas

ACActina G:	Actina globular
Actina F:	Actina filamentososa
CARMIL:	Proteínas multidominio que regulan la actividad de unión a la actina
Dominio TH (Tail Homology):	Dominios de homología de la cola
Dominio PH (homólogo a pleckstrina):	Responsable de la interacción con los fosfoinosítidos de las membranas de la célula
Dominio SH3:	Dominio 3 con homología a la tirosina cinasa Src
GLUT4:	Proteína transportadora de glucosa regulada por la insulina
LFA-1 y VLA-4:	Moléculas de adhesión de la familia de las integrinas
LPS:	Lipopolisacárido de bacterias Gram negativas
MHC:	Proteínas del complejo principal de histocompatibilidad
miRNA:	RNA pequeños no codificantes que se unen a uno o más RNA mensajeros (mRNA) promoviendo su degradación o la inhibición de su traducción
Motivos IQ:	Regiones ricas en los aminoácidos isoleucina (I) y glutamina (Q)
Myo:	Miosina
PI(4,5)P2:	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PI(3,4,5)P3:	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
siRNA:	RNA pequeño de interferencia o de silenciamiento
WASp:	Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich

## 1. Introducción

Las miosinas constituyen una familia de proteínas motoras de los organismos eucariotas que se caracterizan por su capacidad de unirse a filamentos de actina. La capacidad motora está directamente ligada a su propiedad de utilizar energía química para transformarla en energía mecánica. Las miosinas utilizan ATP como sustrato cuya hidrólisis promueve cambios conformacio-

nales que le permiten su desplazamiento sobre los filamentos de actina. La miosina mejor estudiada es la que se encuentra en los músculos y es la responsable de la contracción de estos tejidos; esta miosina, también llamada “muscular” o “convencional” está constituida por homodímeros [1].

En 1973 se describió por primera vez la existencia de una miosina monomérica en la ameba de vida libre *Acanthamoeba castellanii*. Dicha proteína no forma dímeros por lo que desde entonces se ha utilizado el término “clase I” para describir miosinas que no forman dímeros y poder diferenciarlas de las miosinas de “clase II” que forman homodímeros [1, 2]. A la fecha existe una gran cantidad de miosinas “no musculares”, también denominadas “no convencionales”, tanto de clase I como de clase II.

Las miosinas se distribuyen tanto en organismos eucariotes unicelulares como pluricelulares. El análisis filogenético de estas moléculas muestra que todas las miosinas de clase I provienen de una miosina ancestral y comparte algunas características relacionadas entre ellas. Existen diversas clasificaciones para las miosinas. En el 2005 se describieron 37 combinaciones de dominios de proteínas diferentes (clases), a menudo específicas de linaje [3]. En el 2006, se reportó la presencia de 18 clases basada en el análisis filogenético de sus cabezas conservadas [4]. La clasificación más reciente considera el análisis de la secuencia de 2269 dominios motores de miosina de 328 organismos, que sugiere la presencia de 35 clases de miosinas [5]. Esta clasificación varía según la especie; por ejemplo, en los humanos se describen 12 clases de miosinas [6].

Podemos encontrar miosinas en levaduras, amibas y vertebrados [7]. La clasificación de estas familias presenta discrepancias en el análisis, por lo que se requieren nuevos enfoques, como el análisis filogenético basado en las secuencias de aminoácidos, para esclarecer y definir mejor a cada grupo.

## 2. Estructura de las miosinas

En general, las miosinas están constituidas por uno o dos polipéptidos principales llamados “cadenas pesadas” que varían en longitud según la clase y subclase de miosina. Asociadas a cada cadena

pesada, podemos encontrar un número variable de “cadenas ligeras” que pueden ser calmodulina o moléculas relacionadas con la calmodulina [1]. En la secuencia de cada tipo de cadena pesada de miosina, podemos distinguir tres dominios:

El dominio motor, o cabeza globular, es el más conservado entre las diferentes clases de miosinas; este dominio tiene un sitio de unión a actina F y un sitio para el ATP. A través de su actividad de ATPasa, el dominio motor usa energía derivada de la hidrólisis de ATP para generar cambios en la conformación tridimensional de la proteína que permiten el movimiento a lo largo del filamento de actina; en los casos en que la miosina está anclada a algún otro elemento, son los filamentos de actina los que se movilizan.

El dominio del cuello permite la asociación de la(s) cadena(s) ligera(s) con la cadena pesada, por lo que su secuencia primaria incluye un número variable de motivos ricos en isoleucina y glutamina (IQ) que son directamente responsables de dicha asociación. La unión de las cadenas ligeras permite estabilizar el movimiento del dominio motor, por lo que en el caso de la miosina muscular convencional, se les ha denominado cadenas esenciales y cadenas reguladoras; en el caso de otros tipos de miosinas, las cadenas ligeras de calmodulina o proteínas homólogas a la calmodulina cumplen la misma función, aunque no reciben tales denominaciones; en cualquier caso, la interacción entre ambos tipos de cadenas depende de la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre en el medio intracelular [1, 2].

El dominio de la cola es el menos conservado entre las diferentes clases de miosinas; por tanto, representa la región de la proteína que le da su función específica y define las diferentes interacciones que se pueden llevar a cabo. Los tallos tienen diferentes motivos que pueden mediar la dimerización de las cadenas pesadas; la interacción con la membrana plasmática; con elementos del citoesqueleto; u otras proteínas con diversas funciones, etc., [1-7].

Las miosinas de clase I constan de una sola cadena pesada con el dominio motor ubicado en el extremo amino de la molécula; uno o varios motivos IQ ubicados en la región del cuello, y una región característica de la cola denominada dominio TH1 (Tail Homology) caracterizado por una secuencia rica en aminoácidos básicos. Esta clase de proteínas se puede subdividir en dos grandes grupos: las miosinas de cola corta y las de cola larga; estas últimas tienen además del dominio TH1, un dominio TH2 (con una secuencia rica en prolina) y la región TH3 que corresponde a un dominio SH3 (dominio con homología a Src, lo que permite su interacción con dominios ricos en prolina) (Figura 1) [8].

Tras el descubrimiento de las miosinas de clase I en *Acanthamoeba*, diversos estudios en organismos unicelulares eucariotas como levaduras o *Dictyostelium*, demostraron la participación de estas proteínas en la polimerización de actina, la motilidad celular y el transporte vesicular [7, 8].

Hasta ahora se han identificado, tanto en humanos como en ratones, seis genes diferentes que codifican las miosinas de cola corta de clase I (Myo1a, Myo1b, Myo1c, Myo1d, Myo1g y Myo1h) y dos de cola larga (Myo1e y Myo1f) [8-10]. Su expresión es muy variada, por ejemplo, la Myo1c es ubicua, mientras que la Myo1g se expresa solo en células del sistema hematopoyético (Figura 2). Estas proteínas exhiben una diversidad de funciones mucho mayor en comparación con las miosinas de *Dictyostelium* y no están necesariamente involucradas en los mismos procesos celulares [10].

Las ocho miosinas de clase I poseen diferentes dominios TH1 que permitiría la interacción directa de estas proteínas con distintos fosfoinosítidos distribuidos en las diversas membranas de la célula. Se ha demostrado que las Myo1a, Myo1b, Myo1c y Myo1g se unen al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares. La unión se realiza a través de un motivo del dominio TH1 ubicado entre las dos pri-



Figura 1. Representación esquemática de la estructura de las miosinas de clase I en ratón. Las miosinas de clase I se clasifican en miosinas de cola corta y miosinas de cola larga; ambos tipos de miosinas tienen un dominio motor en la región amino terminal, enseguida se encuentra una región de cuello con uno o más dominios IQ (regiones ricas en los aminoácidos isoleucina y glutamina) y por último, un dominio TH1 (por sus siglas en inglés Tail Homology) en la región de la cola. Este último permite la interacción de la miosina con los fosfoinosítidos de las membranas de la célula a través del dominio PH (homólogo a pleckstrina). Las Myo1e y 1f tienen dos dominios adicionales: TH2 (una región rica en prolina) y TH3 (una región de interacción rica en prolina), lo que permite interacciones proteína-proteína. La estructura lineal de las proteínas se realizó con base en la información obtenida de Uniprot (<https://www.uniprot.org/>).

## Expresión de miosinas de clase I en Leucocitos

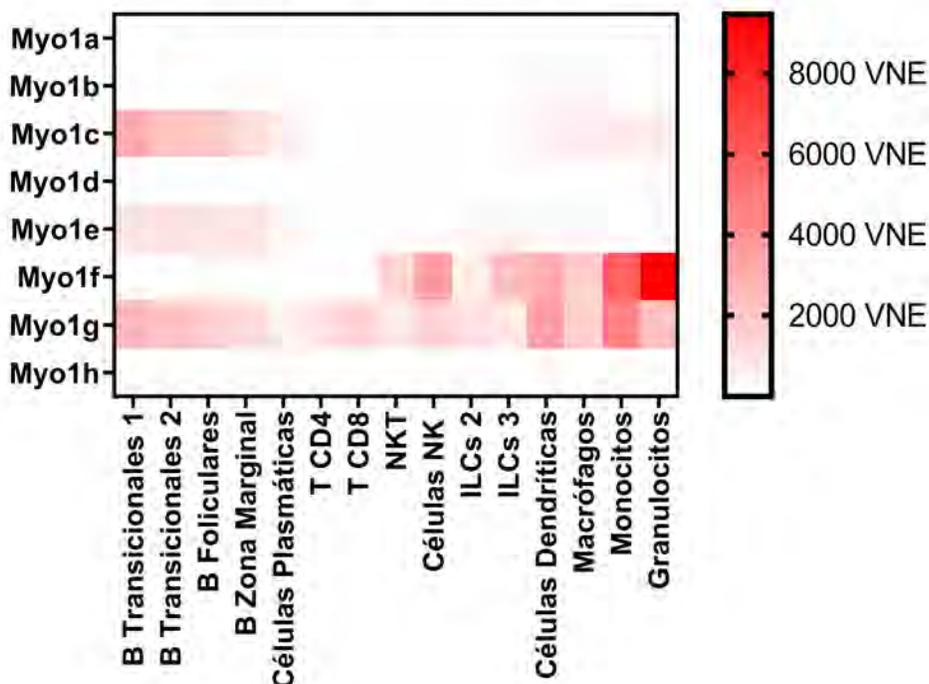


Figura 2. Expresión de miosinas de clase I en leucocitos de ratón. La expresión de las miosinas de clase I en leucocitos se obtuvo con datos de <http://www.immgen.org>. La escala de color, hace referencia a los Valores Normalizados de Expresión (VNE) de los mRNA, reportados en la base de datos de Immgen. El mapa de calor se generó utilizando GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows 10, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU. (<https://www.graphpad.com>).

meras tiras  $\beta$  plegadas que conforman dicha región. El dominio canónico homólogo a pleckstrina (PH) de unión a fosfoinosítidos (incluido en la región TH1) tienen la secuencia general KXn(K/R)XR, ubicada entre las hojas  $\beta 1$  y  $\beta 2$  del dominio; las cadenas laterales básicas de los residuos de arginina y lisina en esta región interactúan con los grupos fosfato de los lípidos permitiendo su asociación [10].

Mediante un alineamiento de las secuencias primarias de las ocho miosinas de clase I es posible observar la presencia del motivo KXn(K/R)XR mostrando variaciones en algunos residuos. En todos los casos, podemos encontrar algunos residuos conservados según la secuencia canónica, pero también hay otros residuos básicos en el bucle que une las hojas plegadas  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , que pueden estar trabajando para mantener las interacciones con los fosfoinosítidos. Es importante notar que diferencias específicas en las secuencias, con los aminoácidos básicos en diferentes posiciones, pueden afectar la afinidad de estas proteínas por diferentes fosfolípidos de membrana. Estas variaciones en secuencia podrían tener implicaciones en la función y la ubicación de cada una de estas miosinas, según la composición y en los cambios inducidos por la señalización en la membrana plasmática de diferentes tipos de células; ejemplo de esto es la generación y polarización de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato en neutrófilos migratorios en respuesta a un estímulo inflamatorio [10].

### 3. Filogenia de las miosinas de clase I

Las miosinas de clase I se conservan entre los diferentes organismos estudiados (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum* y *Acanthamoeba castellanii*) (Figura 3) [6, 7]. El dominio de la cabeza es el más conservado entre las diferentes miosinas de clase I. Otros dominios como el TH1, TH2 y SH3 difieren entre sí, pero conservan sus funciones en la célula, tales como: interacción con fosfolípidos en la membrana plasmática u otras membranas celulares en el caso de los dominios TH1. Para el caso de los dominios TH2 y SH3, también se conserva la interacción con proteínas ricas en prolinas (PPXXPP). La asociación con otras proteínas del citoesqueleto (p. e., la proteína del síndrome Neural de Wiskott-Aldrich) se debe a estos dominios divergentes [3]. Esta habilidad compartida sugiere la presencia de un miembro ancestral común en estos motores celulares. Bajo este razonamiento, la mejor forma de explorar la homología en la secuencia de aminoácidos y la identificación de posibles regiones de divergencia en estas proteínas motoras es mediante análisis filogenéticos. El análisis filogenético define las miosinas de clase I (a, b, c, d, e, f, g y h) en ratones y humanos. Myo1p en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*; Myo3p y Myo5p en *Saccharomyces cerevisiae*; MyoA, MyoE, MyoF, MyoB, MyoC, MyoD y MyoH en *Dictyostelium discoideum* son parálogos de miosinas de cola corta y larga



Figura 3. Mapa filogenético de las miosinas de clase I. La información de las secuencias de proteínas se obtuvo a través de PubMed. El árbol filogenético se construyó utilizando el programa Mega11 (<https://www.megasoftware.net/>). Este análisis incluyó 22 miosinas de clase I y 6 isoformas (Unconventional myosin-Ic isoform c *Mus Musculus*, Unconventional myosin-Ih isoform 1 *Mus Musculus*, Myosin 61F isoform A *Drosophila melanogaster*, Myosin 31DF isoform C *Drosophila melanogaster*, Unconventional myosin-Ic isoform 1 *Homo sapiens*, Unconventional Myosin-1f isoform 1 *Homo sapiens*). Se analizaron secuencias de miosinas de clase I provenientes de las especies: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Dictyostelium discoideum*, *Acanthamoeba castellanii*, *Schizosaccharomyces pombe* (SCHPO) y *Saccharomyces cerevisiae*. El código indicado al inicio de cada nombre, indica los números de accesos de las secuencias en genBank.

y comparten el mismo ancestro común [7]. Estos datos implican que las miosinas de clase I aparecieron temprano en la evolución (Figura 3) [7].

En ratones y humanos existen algunas diferencias entre las miosinas de clase I como los niveles de expresión y la expresión tisular diferencial [10], además de la localización cromosómica; por ejemplo, la miosina 1e en humanos se encuentra en el cromosoma 15 y la miosina 1e en ratones se localiza en el cromosoma 9. Sin embargo, estas miosinas son muy similares en estructura (98%) y la distancia entre ellas es muy corta en el árbol filogenético [11].

#### 4. Miosina 1C

La Myo1c presenta una distribución amplia en diversas células y tejidos. Se localiza principalmente en zonas adyacentes a la membrana plasmática, formando parte de estructuras como las copas fagocíticas de los macrófagos [12], o los autofagosomas en las células HeLa [13], y en la fusión de membranas en los fibroblastos 3T3 [14]. La Myo1c se encuentra asociada a vesículas que contienen GLUT4 tras la estimulación con insulina [15]. El aumento en la expresión de esta miosina correlaciona con una mayor presencia de la proteína transportadora de glucosa regulada por la insulina (GLUT4) en la superficie celular. La inhibición de PI3K

en estas células conduce a la alteración de la exocitosis de vesículas que contienen GLUT4 debido a que esta cinasa es requerida para el proceso de fusión de membranas [15]. La Myo1c se asocia con la proteína de andamiaje 14-3-3, con el compañero insensible a la rapamicina del blanco en mamíferos de la rapamicina y con la proteína asociada a Ras, RalA [16]. La sobreexpresión de Myo1c en células HeLa promueve la presencia de balsas lipídicas en la membrana plasmática [17]. La Myo1c ayuda a la movilización del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y al transporte de actina G al polo principal en las células endoteliales [18]; y al tránsito e intercambio de proteínas de carga en las células MDCK [19].

Existen 3 isoformas de Myo1c con diferencias en las regiones N-terminales [20]. Una isoforma de Myo1c, con secuencia de localización nuclear, se puede detectar en el núcleo de las células, donde se ha mostrado que interactúa con las RNA polimerasas I y II [21]. Se sugiere que la Myo1c forma parte del complejo de remodelación de la cromatina B-WICH [22]. Estos datos sugieren la participación de esta proteína en el proceso de transcripción, pero el mecanismo aún no se conoce con certeza. Una posibilidad es que la Myo1c, junto con los microfilamentos, podría ser parte de un andamiaje para la formación de complejos de pre-iniciación o quizás, la miosina sirva como motor auxiliar para la síntesis de mRNA [22].

En las células del sistema inmunitario, la Myo1c también se ha detectado muy cerca de la membrana plasmática. En las células B, la Myo1c se localiza en estructuras y zonas con un enriquecimiento de F-actina, como las extensiones similares a las dendritas de estos linfocitos. Esta miosina se encuentra en las balsas lipídicas de estas células donde muestran una fuerte colocalización con las moléculas del MHC-II. Una línea celular de linfocitos B (A.20), transfectada con una forma dominante negativa de Myo1c o con un siRNA específico, produce alteraciones en su proliferación y su capacidad para presentar antígenos [9, 23].

La Myo1c es un marcador potencial de enfermedades autoinmunes, por ejemplo, un péptido de la Myo1c se encuentra en altas concentraciones en el suero de pacientes con esclerosis y artritis reumatoide, pero está ausente en pacientes con lupus eritematoso sistémico [24]. En general, la Myo1c tiene diversas funciones en la fisiología celular, siendo el miembro más versátil de esta familia debido a las numerosas interacciones descritas hasta ahora. Aunque la Myo1c carece de dominios de interacción directa con algunas proteínas, la cadena ligera asociada podría promover dicha interacción; incrementando las posibilidades de acción para esta molécula.

### 5. Miosina 1D

La Myo1d presenta una alta expresión durante el desarrollo del sistema nervioso central, específicamente en oligodendrocitos en fases tardías [25]. La disminución de la Myo1d conduce a la degeneración de las proyecciones de membrana, a la retracción celular, a la apoptosis y al deterioro del transporte intracelular de la proteína proteolípida de mielina [25]. La Myo1d es esencial para mantener la polaridad en las células epiteliales de la tráquea de ratas [26].

En un contexto más inmunológico, la expresión de Myo1d se incrementa en la respuesta a la serotonina de macrófagos alveolares murinos [8-10]. La expresión alterada de Myo1d en células dendríticas de la médula ósea (provocada por miR-155 y miR-674) conduce a la pérdida de la capacidad de incrementar la expresión de CD86 y MHC-II en la membrana plasmática. Estos microRNAs, especialmente el miR-155, se regulan positivamente en respuesta al tratamiento con neuraminidasa (proteína estructural del virus de la influenza aviar H9N2) [27].

La Myo1d tiene dos motivos IQ con los que interacciona con la calmodulina; y se ha demostrado que la presencia de  $Ca^{2+}$  inhibe la actividad ATPasa de su dominio motor. Experimentos *in vitro* muestran que la fusión de los endosomas tempranos puede inhibirse mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra la región de la cola de esta miosina; estos datos apuntan a la participación de esta proteína en el tránsito vesicular [8-10]. Existen muy pocos reportes que analicen las funciones de la Myo1d en los leucocitos, por lo que este es un área de oportunidad para quien quiera dedicarse a su estudio.

### 6. Miosina 1E

La Myo1e se identificó inicialmente en áreas ricas en actina cercanas a la membrana celular [28]. Además, la Myo1e es un componente importante del invadosoma de las células BHK-21 transformadas por el virus sincitial respiratorio. El invadosoma es una estructura de adhesión rica en actina, importante para la degradación y la invasión de la matriz extracelular [8-10]. La Myo1e se encuentra en los podocitos de los glomérulos de los riñones [29]. Estas células forman una red estrecha que consta de procesos interdigitales ricos en actina filamentosos (pedicelos) que controlan la fuga de proteínas [29]. La Myo1e tiene un papel crucial en varias funciones de los podocitos, como la endocitosis, la adhesión y la migración celular [29]. Los ratones deficientes en Myo1e, muestran un alto nivel de daño renal que se correlaciona con proteinuria e inflamación renal; además, los pedicelos de los podocitos se ven claramente alterados [30].

Los estudios en macrófagos encontraron que esta miosina rodea a los fagosomas recién formados. La expresión de la Myo1e se regula positivamente durante el tratamiento de células dendríticas humanas con nanoesferas de poliestireno recubiertas con toxoide tetánico (probablemente unidas a los fagosomas). Estas microestructuras internas están enriquecidas en componentes de la membrana plasmática (como los fosfolípidos) y por el citoesqueleto de actina. Así, se sugiere que la Myo1e podría ayudar en los reordenamientos del citoesqueleto de actina. La Myo1e se acopla a los homólogos de la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp) en *Dictyostelium* lo que sugiere un posible vínculo de Myo1e con WASp y CARMIL; estas proteínas podrían interactuar con el complejo nucleador de actina en vertebrados [8-10].

La cola de la Myo1e se une a vesículas unilamelares grandes que contienen fosfolípidos aniónicos como PI(4,5)P2 o fosfatidilserina [31]. Este dato es relevante debido a que los fosfolípidos PI(4,5)P2 se concentran inicialmente en la copa fagocítica, seguida de su pérdida cuando el fagosoma se sella. La pérdida de PI(4,5)P2 correlaciona con la formación localizada de diacilglicerol en estas microestructuras y con niveles altos de fosfatidilserina durante la fusión completa de endosomas y lisosomas [31]. Estos resultados sugieren que la Myo1e es esencial en el proceso fagocítico.

En contraste con las miosinas de cola corta, las miosinas de clase I de cola larga, como la Myo1e, tienen dominios de interacción adicionales (TH2 y SH3). La Myo1e coopera a través de su dominio TH3 con la sinaptojanina-1 y la dinamina, ambas moléculas involucradas en la endocitosis [8-10]; y en procesos de tránsito vesicular, por la asociación con la proteína 1 específica de linfocitos, molécula implicada en la fagocitosis mediada por el receptor Fc gamma en macrófagos [8-10], o la asociación de Myo1e con MHC-II durante la movilización en células dendríticas humanas [32]. La Myo1e es un miembro del grupo de genes candidatos que son un blanco de la tirosina cinasa de Bruton, esta cinasa es una pieza fundamental en la transducción mediada por el receptor de antígeno de los linfocitos B ya que es necesaria para varias funciones en estas células, como su maduración y su diferenciación hacia células efectoras [33]. La Myo1e interacciona

con la cinasa de adhesión focal, específicamente con el dominio rico en prolina en la región 1 [34].

El trabajo dentro de nuestro laboratorio ha permitido generar datos que han demostrado el papel crucial de la miosina 1e en la migración celular de los linfocitos B. Este fenómeno se ha observado en el ganglio linfático utilizando como quimioatrayente a la quimiocina CXCL12 y registrado los movimientos de las células B por microscopía intravital. En estos experimentos, la ausencia de Myo1e en las células B genera una deficiencia en la adhesión celular y una reducción en el rodamiento lento de los linfocitos en la vénula de endotelio alto, en comparación con los ratones silvestres. Este defecto se explica por la deficiencia en la expresión de las moléculas de adhesión de la familia de las integrinas LFA-1 y VLA-4. También se observaron alteraciones en las prolongaciones de la membrana de las células B en los ratones deficientes de Myo1e, lo que trae como consecuencia las deficiencias en la migración *in vivo* de los linfocitos B [35].

Asimismo, con una metodología semejante, contribuimos a mostrar que los neutrófilos que carecen de Myo1e tienen una polimerización defectuosa del citoesqueleto de actina, defectos en la activación de las integrinas y un comportamiento de rodamiento aberrante denominado “rodamiento intermitente”, lo que sugiere que la miosina es importante para fortalecer las interacciones adhesivas de los neutrófilos con el endotelio vascular [36].

## 7. Miosina 1F

La Myo1f tiene una longitud de 1098 aminoácidos en humanos y 1099 aminoácidos en ratones (<https://www.uniprot.org/>). Su expresión se ha confirmado en neutrófilos, macrófagos, células cebadas (mastocitos) y linfocitos T. Como se mencionó anteriormente, Myo1f tiene dos dominios adicionales, un TH2 y un SH3 que permiten la interacción con varias proteínas. Se ha observado que la Myo1f interactúa con 3BP2, activando Cdc42, lo que sugiere una vía que involucra a Vav1, una proteína intercambiadora de guanina, que potencialmente activa a Rac y RhoA, dos proteínas de unión a GTP relacionadas con Ras que controlan el ensamblaje y desensamblaje del citoesqueleto de actina, regulando así la maquinaria del citoesqueleto para favorecer los cambios morfológicos y la generación de protrusiones de membrana [8-10].

De manera similar a la Myo1e, la Myo1f se ubica en áreas enriquecidas en F-actina en diferentes tipos de células; de especial interés son las células del sistema inmunitario, en las que esta proteína muestra altos niveles de expresión [37]. En los macrófagos, Myo1f es un componente de los conductos de unión (también llamados TNT) de los macrófagos derivados de monocitos; estas conexiones son manipuladas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) para transferir viriones a otras células [38]. Estas protuberancias de la membrana son soportes que conducen a larga distancia el transporte intercelular de organelos, receptores y moléculas de RNA. Estas microestructuras están constituidas principalmente por filamentos de actina y microtúbulos; sin embargo, varias proteínas como las GTPasas están involucradas en la producción y mantenimiento de las TNTs. La longitud de las TNTs es variable entre diferentes tipos de células, por ejemplo, en

macrófagos la extensión de estas microestructuras es de alrededor de 100 µm. Los microorganismos, como virus, priones y bacterias, podrían usar estos conductos para “burlar” las respuestas inmunitarias y permitir que la infección se propague; por ejemplo, el VIH-1 utiliza monocitos, macrófagos y células dendríticas para trasladarse de una célula a otra [38].

En los neutrófilos, la Myo1f parece controlar la exocitosis de vesículas que contienen integrinas  $\beta 2$ . Los neutrófilos deficientes en Myo1f muestran un mayor nivel de exocitosis que se correlaciona con un aumento en la expresión de estas moléculas de adhesión superficiales de alta afinidad. Este fenómeno tiene implicaciones *in vivo*, donde la mayor adhesión de los neutrófilos impide su correcta migración y promueve infecciones en ratones con patógenos como *Listeria monocytogenes* [37]. Estos datos sugieren que la Myo1f podría estar regulando la tensión cortical generada por los filamentos de actina, asociados a la membrana plasmática de estas células y, por lo tanto, si esta miosina está ausente, se produce una disminución de la integridad de esta red de microfilamentos que podría provocar una pérdida en el control de la exocitosis de las integrinas.

Otros ejemplos del probable papel de la Myo1f en la regulación de las funciones de las células del sistema inmunológico es la observación de que la expresión de la Myo1f se incrementa después de la estimulación de CD28 en los linfocitos T, probablemente impactando en algunas funciones efectoras de estas células [39]. También se ha descrito que macrófagos derivados de pacientes con deficiencia de CD40L (CD154) presentan alteraciones en la expresión de Myo1f; esta deficiencia se atenúa después del tratamiento con interferón gamma recombinante humano [40].

Recientemente, las Myo1f y 1e se han relacionado en la propagación, la liberación de quimiocinas y la presentación de antígenos en macrófagos. La fosforilación de las Myo1e y 1f ha sido reportada en macrófagos tratados con lipopolisacárido (LPS), esta fosforilación parece regular la activación de estas proteínas motoras [10].

Es interesante mencionar la existencia de algunos casos en donde el gene humano de la Myo1f se fusiona con el gene MLL (leucemia mielo-monocítica) en la leucemia monocítica aguda. Hasta el momento no se sabe con certeza cómo la fusión Myo1f-MLL participa en la generación de leucemia, ni cómo puede estar involucrada la pérdida o ganancia de funciones de la Myo1f [10]. Otro caso de fusión de la Myo1f se da con el protooncogén Vav1 en linfomas de células T periféricas [41]. Estas fusiones podrían suponer una posible función de esta proteína motora en la progresión del cáncer.

Nuestro laboratorio ha publicado que durante la inflamación, los macrófagos mejoran sus propiedades de adhesión intercelular para adquirir un fenotipo proinflamatorio M1. Encontramos que la adhesión intercelular está mediada por la integrina- $\alpha V\beta 3$  y requiere de la participación de la Myo1f. La adhesión intercelular mediada por  $\alpha V\beta 3$  estimula el fenotipo M1 en los macrófagos a través de la hiperactivación de STAT1 y STAT3 vía la señalización de ILK/Akt/mTOR. La inhibición de la integrina- $\alpha V\beta 3$ , Akt/mTOR o la falta de Myo1f atenuaron la diferenciación de los macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio. En un modelo de colitis, la deficiencia de Myo1f redujo fuertemente la secreción de citocinas proinflamatorias, disminuyendo el daño epitelial, mejo-

rando la actividad de la enfermedad y mejorando la reparación de tejidos [42].

## 8. Miosina 1G

La primera descripción de la Myo1g fue la identificación de esta proteína como miembro del antígeno de histocompatibilidad menor humano HA-2. Este complejo es crucial para establecer un trasplante de médula ósea exitoso. El gene de la Myo1g está ubicado en el brazo corto del cromosoma 7. Hasta el momento, el gene de la Myo1g presenta dos variantes genéticas, denominadas Myo1g (V) y Myo1g (M) con la respectiva secuencia: YIGEVLVSV o YIGEVLVSM. Ambas variantes pueden asociarse al MHC HLA-A\*0201, aunque este cambio en la secuencia tiene un efecto pequeño sobre la unión del péptido al MHC y el reconocimiento por parte de las células T [43]. Cabe mencionar la susceptibilidad de este gene para modificar su metilación en respuesta al humo del cigarrillo [10].

La Myo1g tiene una longitud de 1018 aminoácidos en humanos y 1024 aminoácidos en ratones y pertenece al grupo de miosinas de cola corta. Tiene un dominio tipo PH en la región de la cola, lo que le permite unirse a los lípidos de la membrana plasmática y a microdominios ricos en fosfolípidos y colesterol, conocidos como balsas lipídicas [8-10]. La expresión de Myo1g se ha observado principalmente en linfocitos tanto T como B y en células cebadas (mastocitos) [8-10].

La Myo1g ha sido propuesta como un puente que permite la adecuada interacción entre la membrana y el citoesqueleto en procesos de la secreción de citocinas, la migración celular, la movilización, el reciclaje de moléculas de membrana y la regulación de modificaciones en el citoesqueleto que favorecen la adhesión celular [8-10].

Varios estudios sitúan a Myo1g como una miosina exclusiva de células hematopoyéticas, donde sus niveles de expresión varían entre los diferentes linajes, siendo especialmente abundante en las células B y en las células T activadas [44]. El perfil proteómico de espectrometría de masas de las proteínas de los linfocitos indica que la Myo1g es en realidad la miosina de clase I más abundantemente expresada por los linfocitos T. Los ensayos de inmunofluorescencia localizan a la Myo1g en la membrana plasmática, particularmente enriquecida en las microvellosidades de la superficie celular de los linfocitos T y B [45]. Además, la Myo1g está presente en las balsas lipídicas de los linfocitos B y de neutrófilos [8-10]. Se ha sugerido que la Myo1g podría estar involucrada en la regulación activa de los niveles de linfocitos B en humanos; tal suposición surge de la hipótesis de la presencia de un locus en el cromosoma 7, que se asocia con los niveles de células B. En este locus, Myo1g está presente y es regulada por el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs10277809. La presencia de este SNP afecta los niveles de expresión de Myo1g, proponiendo un nuevo papel para este motor molecular.

Aunque actualmente existen muy pocos informes sobre el papel de la Myo1g, se sabe que esta proteína motora está involucrada en el mantenimiento y la regulación de la tensión de la membrana plasmática en las células donde se expresa, especialmente

en los linfocitos T y B. Mediante el uso de RNA de interferencia específico para la Myo1g o con ratones deficientes de Myo1g, se ha demostrado que la elasticidad de la membrana de las células T y B se ve disminuida debido a la deficiencia de esta proteína motora [46].

La Myo1g se une al fosfatidilinositol 3,4 bisfosfato y al fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato en la membrana plasmática [8-10]. Está ampliamente reportada la alta concentración de estos fosfolípidos en varios tipos de endosomas, de esta manera se ha descrito la presencia de Myo1g en estos compartimentos de membrana. Por ejemplo, la Myo1g está presente en los endosomas de los linfocitos B primarios (linfocitos obtenidos directamente de ratones) y en la línea celular de linfocitos B humanos "Raji"; en los exosomas secretados por linfocitos T primarios previamente estimulados con lectina fitohemaglutinina (PHA) + IL-2; en exosomas derivados del timo humano; en linfocitos B humanos infectados con el virus de Epstein Barr (EBV); y en microvesículas de neutrófilos humanos [8-10]. También la Myo1g se observa en exosomas de linfocitos B tratados con LPS en posible asociación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) [47].

La Myo1g también se encuentra en viriones del VIH liberados por la línea celular THP-1, en células THP-1 estimuladas con LPS, en exosomas de la línea celular de macrófagos de ratón "J774" infectada con *Leishmania mexicana*, o en exosomas de cáncer pulmonar y colon-rectal [8-10]. La incidencia de Myo1g en estos compartimentos de membrana sugiere un papel estructural importante en una variedad de tipos celulares; sin embargo, se desconoce la función exacta de esta proteína en las vesículas antes descritas.

Datos de nuestro grupo han descrito la participación de la Myo1g en el reciclaje de balsas lipídicas y de la molécula de adhesión CD44 en los linfocitos B del ratón. La ausencia de este motor celular retrasa la salida de CD44, "secuestrando" al CD44 y a las balsas lipídicas dentro del linfocito B, en una posible asociación con la GTPasa RhoA [47, 48]. La ausencia de la Myo1g conduce a una reducción de las protuberancias de la membrana en los linfocitos B, causando posibles problemas en la comunicación y en la migración celular [45-48]. Recientemente, la Myo1g se ha relacionado con la vía de la apoptosis, ya que se demostró la disminución en la expresión de la Myo1g en la línea celular HL-60 en respuesta al trióxido de arsénico. En las plaquetas de ratón, se cree que las Myo1g, 1c y 1f participan en la excitación [8-10].

Las células NK expresan mRNA de Myo1g y Myo1f desde las primeras etapas del su desarrollo (<https://gexc.riken.jp>). Las células NK de sangre periférica humana también muestran niveles altos de mensajero para Myo1g y Myo1f (<https://www.proteinatlas.org>). Curiosamente, los linfocitos ILC1 y NK residentes en el tumor también expresan Myo1g y Myo1f. Estos resultados sugieren que tanto las células NK de ratón como las humanas expresan ambas miosinas y que la expresión se mantiene en el contexto de su efecto antitumoral. Por tanto, sería fundamental analizar el papel de estas miosinas en la diferenciación, desarrollo y funciones de las células NK [49].

En general, es fácil deducir que la Myo1g es importante en diversas funciones de las células hematopoyéticas como el tránsito

vesicular, debido a su expresión en algunos compartimentos de membrana, en asociación con determinados fosfolípidos, lo que podría explicar algunas de sus funciones. Sin embargo, la variedad de funciones realizadas por las células hematopoyéticas requiere un análisis específico para cada contexto celular. Por esta razón, es necesario seguir explorando las funciones en las que la Myo1g está involucrada para aclarar algunas funciones específicas y aumentar nuestro conocimiento acerca de la contribución de esta proteína motora en las funciones efectoras y en la regulación del sistema inmunológico.

## 9. Conclusiones

Las miosinas de clase I reportadas en los leucocitos regulan procesos que requieren la interacción entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina, como la secreción de citocinas, la migración celular y la movilización de moléculas de la membrana plasmática. En los últimos años, el concepto convencional de miosinas ha avanzado mucho. Las miosinas se han convertido de un simple conector o transductor en las células musculares para ser un actor importante en la dinámica actina-citoesqueleto. El estudio reciente de las miosinas de clase I con enfoques biofísicos, bioquímicos, estructurales y funcionales han revelado las capacidades, ventajas, restricciones y desventajas de estas proteínas motoras. Entre las funciones de los ocho miembros de las familias de clase I, solo la Myo1c ha sido ampliamente explorada, por lo que se necesitan más estudios para aumentar el campo de conocimiento. Estos motores moleculares muestran diversos patrones de expresión entre diversas poblaciones celulares, lo que sugiere funciones específicas; sin embargo, en algunos casos, la falta de uno de estos miembros pudiera ser parcialmente reemplazado por otro miembro de la misma familia. Por esta razón, es importante abordar estos estudios con un uso más amplio de herramientas para lograr un mejor entendimiento de aquellas funciones específicas e identificar aquellas otras donde pudieran detectarse funciones de compensación entre ellas.

## Agradecimientos

Agradezco a los integrantes de mi laboratorio quienes por más de veinte años han contribuido a un mejor conocimiento de las miosinas de clase I en las células de la respuesta inmunológica, algunos de sus trabajos están referidos en este capítulo. También agradezco especialmente al M. en C. Carlos Emilio Miguel Rodríguez por la elaboración de las figuras que acompañan a este texto.

## Referencias

[1] Krendel, M., y M. S. Mooseker, Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology* (Bethesda), 2005. 20: p. 239-51.  
 [2] Oshero, N., y G. S. May, *In vivo* function of class I myosins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 2000. 47(3): p. 163-173.  
 [3] Richards, T. A., y T. Cavalier-Smith, Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature*, 2005. 436(7054): p. 1113-8.

[4] Foth, B. J., M. C. Goedecke, y D. Soldati, New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(10): p. 3681-6.  
 [5] Odronitz, F., y M. Kollmar, Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol*, 2007. 8(9): p. R196.  
 [6] Pasha, S. N., Meenakshi, I., Sowdhamini, R., Revisiting myosin families through large-scale sequence searches leads to the discovery of new myosins. *Evol Bioinforma* (2016) 12:201-11.  
 [7] Thompson, R. F. y G. M., Langford, Myosin superfamily evolutionary history. *Anat Rec*, 2002. 268(3): p. 276-89.  
 [8] Maravillas-Montero, J. L., Santos-Argumedo, L., The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. *J Leukoc Biol* (2012) 91:35-46.  
 [9] Santos-Argumedo, L., Maravillas-Montero, J. L., López-Ortega, O., Class I myosins in B-cell physiology: functions in spreading, immune synapses, motility, and vesicular traffic. *Immunol Rev* (2013) 256:190-202.  
 [10] Girón-Pérez, D. A., Piedra-Quintero, Z. L., Santos-Argumedo, L., Class I myosins: highly versatile proteins with specific functions in the immune system. *J Leukoc Biol* (2019) 105:973-81.  
 [11] Berg, J. S., B. C. Powell, y R. E., Cheney, A millennial myosin census. *Mol Biol Cell*, 2001. 12(4): p. 780-94.  
 [12] Wagner, M. C., B. Barylko, y J. P. Albanesi, Tissue distribution and subcellular localization of mammalian myosin I. *J Cell Biol*, 1992. 119(1): p. 163-70.  
 [13] Brandstaetter, H., et al., Loss of functional MYO1C/myosin 1c, a motor protein involved in lipid raft trafficking, disrupts autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 2014. 10(12): p. 2310-23.  
 [14] Bose, A., et al., Unconventional myosin Myo1c promotes membrane fusion in a regulated exocytic pathway. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(12): p. 5447-58.  
 [15] Bose, A., et al., Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. *Nature*, 2002. 420(6917): p. 821-4.  
 [16] Hagan, G. N., et al., A Rictor-Myo1c complex participates in dynamic cortical actin events in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(13): p. 4215-26.  
 [17] Brandstaetter, H. J., Kendrick-Jones, y F. Buss, Myo1c regulates lipid raft recycling to control cell spreading, migration and Salmonella invasion. *J Cell Sci*, 2012. 125(Pt 8): p. 1991-2003.  
 [18] Fan, Y., et al., Myo1c facilitates G-actin transport to the leading edge of migrating endothelial cells. *J Cell Biol*, 2012. 198(1): p. 47-55.  
 [19] Tiwari, A., et al., The myosin motor Myo1c is required for VEGFR2 delivery to the cell surface and for angiogenic signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. 304(5): p. H687-96.  
 [20] Zattelman, L., et al., N-terminal splicing extensions of the human MYO1C gene fine-tune the kinetics of the three full-length myosin IC isoforms. *J Biol Chem*, 2017. 292(43): p. 17804-17818.  
 [21] Hofmann, W. A., et al., From transcription to transport: emerging roles for nuclear myosin I. *Biochem Cell Biol*, 2006. 84(4): p. 418-26.  
 [22] Venit, T., et al., Nuclear myosin I regulates cell membrane tension. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 30864.  
 [23] Maravillas-Montero, J. L., et al., Myosin 1c participates in B cell cytoskeleton rearrangements, is recruited to the immunolog-

- ic synapse, and contributes to antigen presentation. *J Immunol*, 2011. 187(6): p. 3053-63.
- [24] Horak, D., *et al.*, Magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres for affinity purification of monospecific anti-p46 kDa/Myo1C antibodies for early diagnosis of multiple sclerosis patients. *Biosci Rep*, 2017. 37(2).
- [25] Yamazaki, R., H. Baba, y Y. Yamaguchi, Unconventional myosin ID is involved in remyelination after cuprizone-induced demyelination. *Neurochem Res*, 2017.
- [26] Hegan, P. S., *et al.*, Myosin Id is required for planar cell polarity in ciliated tracheal and ependymal epithelial cells. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2015. 72(10): p. 503-16.
- [27] Lin, J., *et al.*, MiR674 inhibits the neuraminidase-stimulated immune response on dendritic cells via down-regulated Mbnl3. *Oncotarget*, 2016. 7(31): p. 48978-48994.
- [28] Stoffler, H. E., *et al.*, A novel mammalian myosin I from rat with an SH3 domain localizes to Con A-inducible, F-actin-rich structures at cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 1995. 129(3): p. 819-30.
- [29] Jin, X., *et al.*, Overexpression of Myo1e in mouse podocytes enhances cellular endocytosis, migration, and adhesion. *J Cell Biochem*, 2014. 115(2): p. 410-9.
- [30] Krendel, M., *et al.*, Disruption of Myosin 1e promotes podocyte injury. *J Am Soc Nephrol*, 2009. 20(1): p. 86-94.
- [31] Feeser, E. A., *et al.*, Myo1e binds anionic phospholipids with high affinity. *Biochemistry*, 2010. 49(43): p. 9353-60.
- [32] Paul, P., *et al.*, A Genome-wide multidimensional RNAi screen reveals pathways controlling MHC class II antigen presentation. *Cell*, 2011. 145(2): p. 268-83.
- [33] Lindvall, J. M., *et al.*, Differential expression and molecular characterisation of Lmo7, Myo1e, Sash1, and Mcoln2 genes in Btk-defective B-cells. *Cell Immunol*, 2005. 235(1): p. 46-55.
- [34] Heim, J. B., *et al.*, Myosin-1E interacts with FAK proline-rich region 1 to induce fibronectin-type matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. 114(15): p. 3933-3938.
- [35] Girón-Pérez, D. A., Vadillo, E., Schnoor, M., Santos-Argumedo, L., Myo1e modulates the recruitment of activated B cells to inguinal lymph nodes. *J Cell Sci* (2020) 133:jcs235275.
- [36] Vadillo E., Cháñez-Paredes, S., Vargas-Robles, H., Guerrero-Fonseca, I. A., Castellanos-Martínez, R., García-Ponce, A., Nava, P., Girón-Pérez, D. A., Santos-Argumedo, L. y Schnoor, M., Intermittent rolling is a defect of the extravasation cascade caused by Myosin1e-deficiency in neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019, 116 (52) 26752-26758.
- [37] Kim, S. V., *et al.*, Modulation of cell adhesion and motility in the immune system by Myo1f. *Science*, 2006. 314(5796): p. 136-9.
- [38] Kadiu, I., y H. E., Gendelman, Macrophage bridging conduit trafficking of HIV-1 through the endoplasmic reticulum and Golgi network. *J Proteome Res*, 2011. 10(7): p. 3225.
- [39] Riley, J. L., *et al.*, Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(18): p. 11790-5.
- [40] Cabral-Marques, O., *et al.*, Human CD40 ligand deficiency dysregulates the macrophage transcriptome causing functional defects that are improved by exogenous IFN-gamma. *J Allergy Clin Immunol*, 2017. 139(3): p. 900-912 e7.
- [41] Abate, F., *et al.*, Activating mutations and translocations in the guanine exchange factor VAV1 in peripheral T-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. 114(4): p. 764-769.
- [42] Piedra-Quintero, Z. L., Serrano, C., Villegas-Sepúlveda, N., Maravillas-Montero, J. L., Romero-Ramírez, S., Shibayama, M., *et al.*, Myosin 1F regulates M1-polarization by stimulating intercellular adhesion in macrophages. *Front Immunol* (2019) 10:3118.
- [43] Pierce, R. A., *et al.*, The HA-2 minor histocompatibility antigen is derived from a diallelic gene encoding a novel human class I myosin protein. *J Immunol*, 2001. 167(6): p. 3223-30.
- [44] Patino-Lopez, G., *et al.*, Myosin 1G is an abundant class I myosin in lymphocytes whose localization at the plasma membrane depends on its ancient divergent pleckstrin homology (PH) domain (Myo1PH). *J Biol Chem*, 2010. 285(12): p. 8675-86.
- [45] Maravillas-Montero, J. L., *et al.*, Myosin 1g regulates cytoskeleton plasticity, cell migration, exocytosis, and endocytosis in B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 2014. 44(3): p. 877-86.
- [46] Lopez-Ortega, O., *et al.*, Myo1g is an active player in maintaining cell stiffness in B-lymphocytes. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2016. 73(5): p. 258-68.
- [47] Cruz-Zárate, D., López-Ortega, O., Girón-Pérez, D. A., Gonzalez-Suarez, A. M., García-Cordero, J. L., Schnoor, M., *et al.*, Myo1g is required for efficient adhesion and migration of activated B lymphocytes to inguinal lymph nodes. *Sci Rep* (2021) 11:7197
- [48] López-Ortega, O., Santos-Argumedo, L., Myosin 1g contributes to CD44 adhesion protein and lipid rafts recycling and controls CD44 capping and cell migration in B lymphocytes. *Front Immunol* (2017) 8:1731.
- [49] Cruz-Zárate, D., Miguel-Rodríguez, C. E., Martínez-Vargas, I. U., *et al.*, Myosin 1g and 1f: a prospective analysis in NK cell functions. *Frontiers in Immunology*, 2021.12: 5309.

### LEOPOLDO SANTOS-ARGUMEDO

Investigador principal del departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (<https://www.cinvestav.mx>). Tiene licenciatura en Químico Bacteriólogo y Parasitólogo por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB-IPN), (1980); Maestría (1985) y Doctorado (1989), ambos en la especialidad en Inmunología, por la ENCB, IPN. Realizó estudios posdoctorales en el departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Investigación Médica, Mill Hill, en Londres, Reino Unido (1989-1991); y, en el departamento de Inmunología del Instituto de Investigación DNAX, Palo Alto Cal., EE. UU. (1991-1993). Ha supervisado 27 tesis de doctorado y 40 tesis de maestrías. Es autor de más de cien artículos en revistas indexadas del JCR que tienen más de 2500 citas. Su interés de investigación se enfoca al estudio de los mecanismos de activación, maduración y diferenciación de linfocitos B en humanos y ratones. En los últimos años su trabajo se ha centrado en la búsqueda de la función de las miosinas de clase I en la respuesta inmunológica. Su laboratorio lleva más de una década analizando los mecanismos moleculares en las inmunodeficiencias primarias humanas. Además, recientemente ha iniciado la caracterización de la IgA y el microbioma en calostro humano. Se ha desempeñado como presidente de la Sociedad Mexicana de Inmunología (SMI) (2002-2004), y de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI) (2015-2018). Es miembro del consejo de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) (2015-2025). Pertenecer al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) nivel III, y es miembro numerario de diversas asociaciones científicas, entre las que destacan, la Academia Mexicana de Ciencias, la Academia Nacional de Medicina y la Asociación Americana de Inmunología (AAI).



# Papel de los receptores del sistema inmune innato en el progreso de las enfermedades cardiovasculares

Rafael I Jaén,<sup>\*, 1</sup> Almudena Val-Blasco,<sup>\*, 2, 3</sup> Patricia Prieto,<sup>\*, 4</sup> Marta Gil-Fernández,<sup>\*, 2</sup> Andrea Bueno-Sen,<sup>2</sup> Lisardo Boscá<sup>1</sup> y María Fernandez-Velasco<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC, Madrid, España.

<sup>2</sup> Instituto para la Investigación Hospital Universitario la Paz, IdiPAZ, Madrid, España.

<sup>3</sup> Señalización y Fisiopatología Cardiovascular, UMR-S 1180, Université Paris-Saclay, Inserm, 92296 Châtenay-Malabry, Francia.

<sup>4</sup> Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.

# Comparten primera autoría

\* Autor para correspondencia

**Resumen:** En el presente capítulo vamos a detallar cómo los distintos subtipos de receptores del sistema inmune innato participan en el desarrollo de algunas enfermedades cardiovasculares. Centraremos el contenido en la descripción de los receptores tipo Toll (TLRs) y receptores con dominio de oligomerización por unión de nucleótidos (NLRs). Dentro de los receptores NLR se dedicará especial atención a los receptores NLRP3 y NOD1, ya que son los mayormente estudiados en las enfermedades cardiovasculares. Las patologías que abordaremos abarcan desde las vasculares como la aterosclerosis como las propiamente cardíacas como son la insuficiencia cardíaca o el infarto de miocardio. El objeto fundamental del capítulo es dar una visión general de la importancia del estudio del papel de estos receptores en la patología cardiovascular.

## Abreviaturas

AIM2	Receptor ausente en el melanoma 2
Akt	Proteína quinasa B
AP-1	Proteína activadora 1
ARL	Receptores para AIM2ASC: Proteína tipo speck asociada a apoptosis con dominio CARD
CARD	Dominio de activación y reclutamiento de caspasas
CDR	Receptor de DNA citosólico
CLR	Receptor de lectina tipo C
CIITA	Transactivador de MHC clase II
CVD	Enfermedad cardiovascular
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
EBD	Dominio efector de unión
ER	Retículo endoplásmico
HMGB1	Proteína de alta movilidad del grupo 1
IKKε	IκB quinasa épsilon
IL	Interleucina
IRAK	Quinasa asociada al receptor de interleucina 1
I/R	Isquemia/reperfusión
IRF	Factor regulador del interferón
LDR	Dominio de reconocimiento de ligando
LRR	Repetición rica en leucinas
LV	Ventrículo izquierdo
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MyD88	Proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88
NACHT	Dominio central del receptor del dominio de oligomerización de nucleótidos
NAD(P)	
H oxidasa	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NAIP	Proteína inhibidora de la apoptosis neuronal
NCX:	Intercambiador sodio-calcio
NF-κB	Factor nuclear κ de las cadenas ligeras de las células B activadas
NLR	Receptor tipo NOD
NLRP	Receptor con dominio de oligomerización y unión de nucleótidos, con repeticiones ricas en leucina y dominios pirina.
NOD	Dominio de oligomerización y de unión a nucleótidos

oxLDL	Lipoproteína de baja densidad oxidada
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PYCARD	Que contiene los dominios PYD y CARD
PYD	Dominio pirina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RIG	Familia de proteínas citoplasmáticas del gen inducible por ácido retinoico
RLR	Receptores similares al gen I inducibles por ácido retinoico
RyR2s	Receptor de rianodina tipo 2
SERCA	Bomba ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico
SR	Retículo sarcoplásmico
TBK1	Quinasa de unión a TANK 1
TIR	Dominio citoplásmico de los TLRs
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor de TNF
TRIF	Proteína adaptadora que une al dominio TIR que induce el IFN-β

## 1. Introducción

La teoría propuesta por Polly Matzinger en 1994 supuso un cambio en la comprensión del sistema inmunológico. Esta teoría postula que el sistema inmunológico innato no es capaz de discriminar entre lo propio y lo ajeno, sino que responde a “señales de peligro” que pueden ser de naturaleza tanto exógena como endógena [1]. Las señales de peligro exógenas, frecuentemente conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), son motivos altamente conservados en patógenos microbianos; mientras que las señales de peligro endógenas o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) son moléculas derivadas del estrés y daño celular. Tanto los PAMPs como los DAMPs pueden activar la respuesta inmune innata a través de receptores de reco-

nocimiento de patrones (PRRs) en las células inmunocompetentes, activando cascadas de señalización capaces de desencadenar respuestas inmunológicas frente al daño celular [2].

Los PRRs pueden clasificarse en dos grupos principales según su localización subcelular: 1) las familias de proteínas transmembrana, que incluyen la subfamilia de receptores de tipo Toll (TLRs) y la de los receptores de lectina tipo C (CLR); y 2) las familias de proteínas citoplasmáticas, que engloban la subfamilia de receptores de tipo RIG-I (receptores similares al gen I inducibles por ácido retinoico o RLRs), la de receptores de AIM2 (ausente en melanoma 2 o ARLs), los receptores de DNA citosólico (CDRs) y los receptores de tipo NOD (NLRs) [3].

La respuesta inmune innata está dirigida principalmente por neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, existen otros tipos como células endoteliales, cardiomiocitos y fibroblastos, que expresan estos receptores y contribuyen activamente a la respuesta inmunitaria a través de los PRR [4].

Cada vez existe una mayor evidencia que apoya la idea de que la inmunidad innata se encuentra estrechamente relacionada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (CVDs), en particular con las relacionadas con la isquemia y/o el estrés mecánico (Figura central) [4]. En este sentido, existen numerosos estudios que muestran un papel clave de algunos TLRs y NLRs, presentes tanto en células inmunes residentes en tejido cardíaco como en

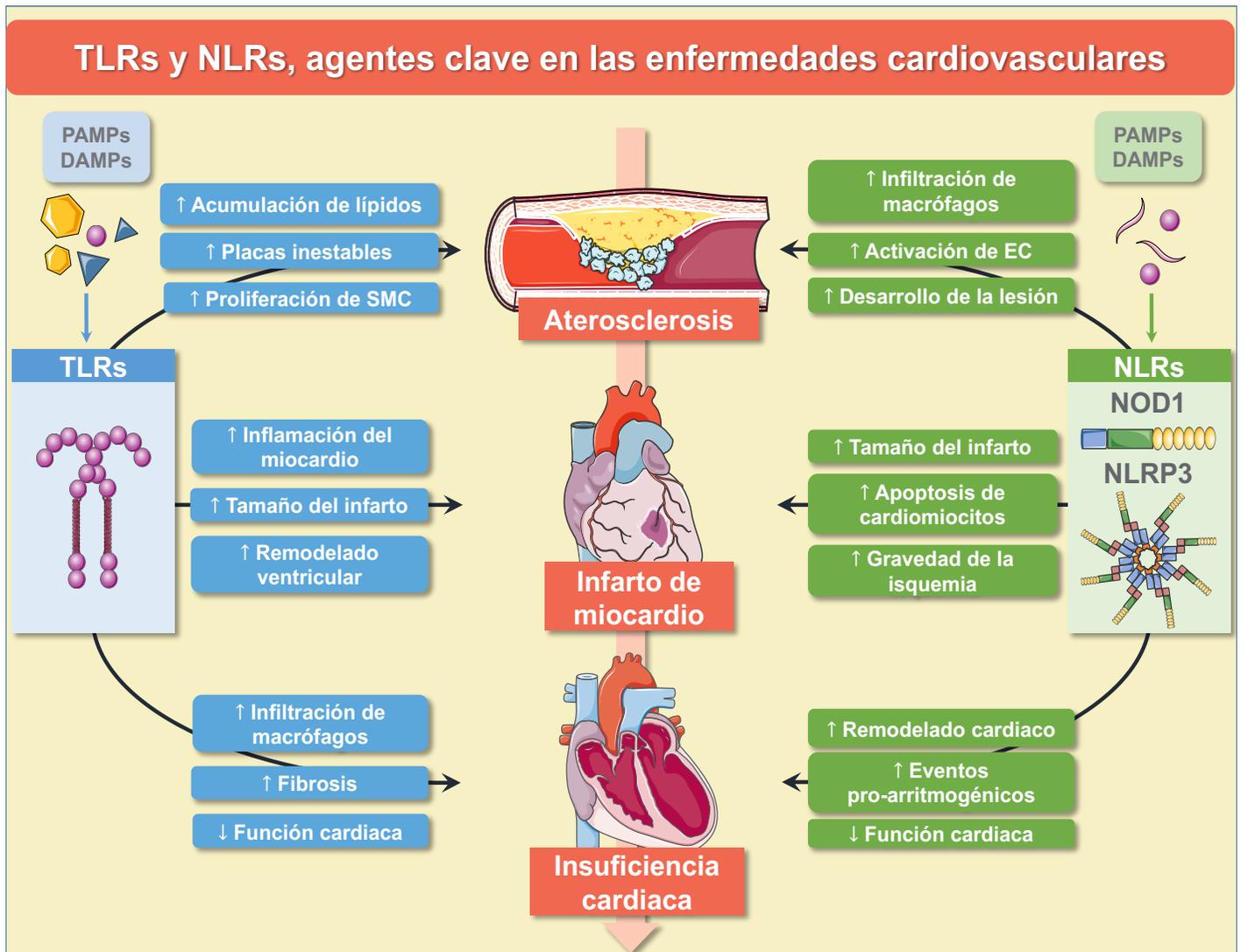


Figura central. Receptores de inmunidad innata en las enfermedades cardiovasculares. Los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores tipo NOD (NLR) desempeñan un papel clave en la aparición de enfermedades cardiovasculares. La figura muestra la posible acción perjudicial de la activación exacerbada de los TLRs y los NLRs en las enfermedades cardiovasculares, centrándose en la aterosclerosis, el infarto agudo al miocardio y la insuficiencia cardíaca como patologías más prevalentes en el mundo. DAMP: patrones moleculares asociados al daño; EC: acoplamiento excitación-contracción; NLRP: receptor con dominio de oligomerización por unión de nucleótidos, repeticiones ricas en leucina y dominio pirina; NOD1: proteína 1 con dominio de oligomerización por unión de nucleótidos; PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos; SMC: célula muscular lisa.

cardiomiocitos, en el inicio, desarrollo y mantenimiento de la respuesta inflamatoria durante, por ejemplo, la insuficiencia cardíaca (IC) o la aterosclerosis [5]. En el presente capítulo se describirán las características clave de los TLRs y NLRs (en particular de NLRP3 y NOD1), focalizando el interés en su papel en el desarrollo de patologías relacionadas con el sistema cardiovascular.

## 2. Receptores de tipo “TLR”

La superfamilia TLRs es clave en la respuesta inmune innata. Está constituida por trece receptores que están muy conservados evolutivamente, desde los vegetales a humanos [6]. El número de TLRs varía entre las distintas especies de mamíferos. De los trece que se conocen, solo diez han sido descritos en humanos puesto que TLR11 no es funcional y TLR12 y trece no se expresan (Figura 1A) [6]. Aunque estos receptores están presentes mayoritariamente en células del sistema inmune, también se ha descrito su presen-

cia en otros tipos celulares como los fibroblastos e incluso células cardíacas y nerviosas. La interacción de PAMPs o DAMPs con los TLRs promueve la activación de una cascada de señalización molecular en estas células que conduce a la activación del sistema inmune innato y al desarrollo de inmunidad adquirida [7].

Los TLRs se pueden clasificar en dos subfamilias dependiendo de su localización subcelular [8]: existen TLRs que se localizan en la membrana plasmática (TLR1, TLR2, TLR4-6 y TLR10), y otros se localizan a nivel endosomal como TLR3 y TLR7-9. Los TLRs que se localizan en la superficie celular reconocen componentes de las paredes microbianas como lípidos, lipoproteínas y proteínas, mientras que aquellos que se encuentran en el interior celular reconocen ácidos nucleicos bacterianos o víricos y además son capaces de diferenciar el material genético propio del ajeno [8]. Los ligandos específicos capaces de interactuar con los distintos TLRs se muestran en la Tabla 1.

Estructuralmente, cada TLR está compuesto por un ectodominio con repeticiones ricas en leucinas (LRRs) que participan en el

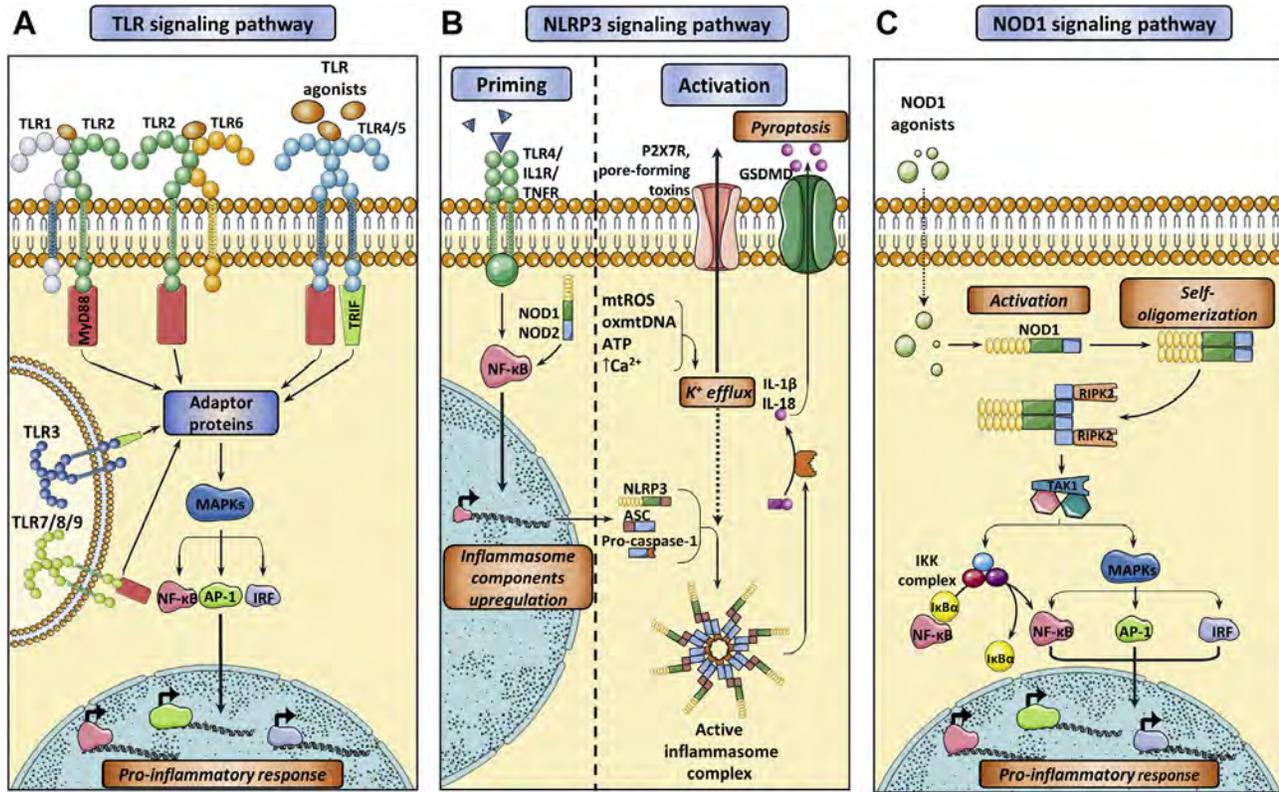


Figura 1. Activación de los principales receptores de inmunidad innata implicados en enfermedades cardiovasculares. A. Vía de señalización de los TLR. La interacción de los agonistas de TLR con su correspondiente receptor TLR activa una vía de señalización que está mediada principalmente por proteínas adaptadoras que son capaces de activar las MAPKs e inducir la traslocación al núcleo de los factores de transcripción NF-κB, AP-1 e IRF, promoviendo la activación de moléculas pro-inflamatorias. Las principales moléculas efectoras de esta vía son MyD88 o TRIF. Se ha representado la unión TLR4/TRIF en la superficie celular por razones de simplicidad, aunque se cree que ocurre en los endosomas tras la internalización del receptor. B. Vía de señalización del inflamasoma NLRP3: “priming” y activación. La activación adecuada del inflamasoma NLRP3 requiere un paso inicial, “priming”, desencadenado por varias citoquinas inflamatorias, que a su vez regulan a la alta la transcripción de los diferentes componentes del inflamasoma. A continuación, una plétora de estímulos que en última instancia provocan el flujo de K<sup>+</sup>, inducen el ensamblaje del inflamasoma, que es capaz de activar IL-1β e IL-18 así como la gasdermina D (GSDMD), lo que conduce a la piroptosis y a una respuesta inflamatoria exacerbada. C. Vía de señalización de NOD1. Los agonistas de NOD1 consisten principalmente en PAMPs y/o DAMPs que inducen cambios conformacionales en NOD1, lo que conduce a la auto-oligomerización del receptor y al reclutamiento de RIPK2. Esta proteína adaptadora desencadena entonces una cascada de señalización que posteriormente activa NF-κB y MAPKs, regulando finalmente a la alta la transcripción de genes proinflamatorios. CVD: enfermedad cardiovascular.

TLR	Localización	Ligandos principales	Patógenos asociados
TLR1	Membrana plasmática	Lipoproteínas triaciladas	Bacterias Micobacterias
TLR2		Lipoproteínas Cimosano Manoproteínas Otros	Bacterias Micobacterias Hongos Protistas Nematodos
TLR4		Lipopolisacáridos Proteínas de choque térmico Oligosacáridos	Bacterias Nematodos Virus
TLR5		Flagelina	Bacterias
TLR6		Lipoproteínas Cimosano	Bacterias Hongos
TLR10		Desconocido	Desconocido
TLR3		Endosomas	dsRNA
TLR7	ssRNA Compuestos sintéticos		Virus
TLR8	ssRNA Compuestos sintéticos		Virus
TLR9	Dinucleótidos CpG no metilados		Virus Bacterias

Tabla 1. Clasificación de los distintos receptores tipo Toll (TLRs) identificados y sus principales activadores. Hay que destacar que los ligandos descritos para los receptores TLR1 y TLR6 solapan con los ligandos de TLR2, ya que se sabe que establecen heterodímeros. Abreviaturas: dsRNA, RNA de doble cadena; ssRNA, RNA de cadena simple; TLR: receptor tipo Toll.

reconocimiento de los PAMPs, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico (TIR) que inicia la señalización dentro de la célula [9]. La interacción de los TLRs con sus ligandos desencadena su dimerización. A continuación, el dominio TIR se une a proteínas adaptadoras como MyD88 o TRIF [10]. MyD88 puede interactuar con todos los TLRs, excepto con TLR3. Dependiendo del tipo de adaptador que se una, varias proteínas quinasas (como IRAK1, IRAK2, IRAK4, TBK1 o IKKε), o ubiquitina-ligasas (como TRAF6 o la proteína pellino 1) son reclutadas y activadas, lo que conlleva a la activación de las cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) [11]. Dentro de la cascada de señalización, la activación de varios factores de transcripción, incluyendo NF-κB, AP-1 y los IRFs son claves para el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Estos factores son capaces de translocarse al núcleo y activar la transcripción de varios genes pro-inflamatorios y además promueven un aumento en los niveles de óxido nítrico y de los interferones, que son directamente tóxicos para los patógenos. La estimulación de los TLRs también contribuye a la maduración de las células dendríticas y, en algunos casos, puede inducir la activación del sistema inmune adaptativo.

Mientras que el reconocimiento de los PAMPs es crucial para la respuesta defensiva del organismo frente a patógenos, una activación aberrante de la señalización vía TLRs inducida tanto por DAMPs como por PAMPs o por mutaciones en los propios receptores se ha relacionado con el desarrollo de patologías de tipo autoinmune, crónicas o alérgicas, con cáncer o enfermedades cardiovasculares [12].

## 2.1. Papel de los TLRs en la progresión de las enfermedades cardiovasculares

Los TLRs se expresan en la mayoría de las células del sistema cardiovascular, incluyendo células endoteliales, células de músculo liso, así como en cardiomiocitos [13]. El tejido cardíaco humano expresa prácticamente todas las isoformas de los TLRs, aunque los niveles relativos de algunos mRNA, como los de TLR2, 3 y 4 son unas diez veces más altos que los del resto. Cada vez existen más evidencias que relacionan la activación del sistema inmune innato mediada por TLRs a nivel del miocardio con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [9]. Cabe destacar que los TLRs juegan un papel dual en el sistema cardiovascular. Así, la activación aguda de los TLRs parece tener efectos protectores, mientras que una activación más prolongada puede inducir el desarrollo de una inflamación crónica que conduce a una disfunción endotelial, un aumento de la muerte celular y, por tanto, a un remodelado cardíaco adverso. A continuación, se describirá el papel de los diferentes TLRs de forma concreta en el desarrollo de patologías de tipo cardiovascular.

### 2.1.1. Implicación de los TLRs en la aterosclerosis y otras enfermedades vasculares

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica desencadenada por la acumulación en la pared arterial de partículas lipídicas (en su mayor parte constituidas por lipoproteínas de baja den-

sidad, oxLDLs), células endoteliales y células espumosas derivadas de macrófagos, dando como resultado una placa de ateroma [14]. Las placas de ateroma pueden llegar a establecerse como placas inestables, que se caracterizan por un núcleo central altamente inflamatorio y necrótico con una gran infiltración de macrófagos y linfocitos rodeados de una cápsula fibrosa y delgada que es propensa de desestabilización y ruptura. Esto altera la homeostasis y hemodinámica vascular e incrementa el riesgo de aterotrombosis, dando lugar a enfermedades cardiovasculares tales como la enfermedad arterial coronaria o el infarto agudo de miocardio (IAM) [15].

La inflamación, por tanto, participa de forma clave en el proceso aterogénico [16], los TLRs y sus cascadas de señalización van a jugar un papel importante en esta patología. De hecho, se sabe que el oxLDL es uno de los principales ligandos de los TLR durante la aterogénesis, siendo capaz de modular la diferenciación de macrófagos hacia células espumosas e inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias [17].

La mayoría de los estudios de los TLRs en la aterosclerosis se centran en el análisis de TLR4 y TLR2, ya que su expresión está aumentada en las placas de ateroma [18] y algunos tratamientos como las estatinas, son capaces de disminuirla [19]. De hecho, en ratones deficientes de apolipoproteína E (*Apoe*<sup>-/-</sup>), en los que se genera aterosclerosis de manera espontánea al exponerlos a una dieta rica en grasas, se ha demostrado que la supresión génica de *Tlr4* o *Tlr2* conlleva una reducción en la acumulación de células espumosas y una menor severidad de la enfermedad con respecto a los ratones *Apoe*<sup>-/-</sup> control [20]. Cabe destacar que Stewart y cols., (2010) determinaron que la regulación de CD36 mediada por el oxLDL es capaz de iniciar una respuesta inflamatoria mediante la activación del heterodímero TLR4/TLR6, [21], indicando nuevos procesos aterogénicos relacionados con este receptor.

La función de TLR2 en la aterosclerosis parece ser más compleja, ya que para ejercer su acción se asocia normalmente con TLR1 o TLR6. De hecho, la expresión de ambos heterodímeros (TLR2/1 y TLR2/6) está incrementada en la placa de ateroma [18]. A grandes rasgos, la activación de TLR2 tiende a estimular el crecimiento y desarrollo de la placa mediante la acumulación de lípidos [22], la inflamación de células endoteliales [18], y la proliferación y migración de células del músculo liso [23]. Cuando se profundizó en el estudio del papel de los heterodímeros de TLR2 en la aterosclerosis, se encontró que los ratones ateroscleróticos deficientes en *Tlr1* o en *Tlr6* mostraban una enfermedad similar a los controles [24], lo que sugiere que TLR2 contribuye al proceso aterogénico por sí mismo, en lugar de los otros componentes del complejo.

Además de la aterosclerosis, los TLRs también se han asociado a otras enfermedades vasculares como la hipertensión [25] o el aneurisma aórtico abdominal [26]. Concretamente, la contribución de TLR4 a la patología hipertensiva se ha descrito en varios modelos experimentales [27]. También se ha visto que la activación de TLR9 se asocia a un aumento de la presión arterial, dando lugar a alteraciones vasculares en ratas normotensas [28]. Del mismo modo, la inhibición de este TLR reduce la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas [29].

En el aneurisma aórtico abdominal también se ha observado una gran implicación del TLR4 en el progreso de la patología. Su inhibición en varios modelos experimentales impidió la dilatación

de la aorta y la progresión del aneurisma [26]. La inhibición de TLR2 también mejoró esta patología en ratones [30]. Finalmente, cabe destacar que TLR3 parece estar asociado a esta enfermedad ya que su expresión se encontró aumentada en la pared arterial en pacientes [31], pero su papel específico en el aneurisma aórtico abdominal aún se desconoce.

## 2.1.2. Papel de los TLRs en la patología cardíaca

### 2.1.2.1. Infarto agudo de miocardio

A pesar de los enormes avances que se han realizado en los últimos años en el abordaje terapéutico del infarto agudo de miocardio (IAM), éste continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo [32]. El IAM cursa en la mayoría de los casos con una obstrucción de las arterias coronarias a consecuencia de un trombo. La restauración del flujo de sangre al miocardio isquémico se conoce como reperfusión y se ha asociado con un mayor daño en el tejido cardíaco principalmente por los efectos tóxicos de las especies reactivas del oxígeno (ROS) que se generan durante esta etapa [33]. Existen numerosas evidencias que sugieren que el sistema inmune innato juega un papel fundamental iniciando la respuesta inflamatoria en el corazón, lo que origina un daño tisular. Así, en pacientes con angina de pecho inestable o IAM, las células cardíacas que han sufrido daño liberan gran cantidad de moléculas que actúan como DAMPs endógenos y que pueden activar la señalización a través de los TLRs. Entre estos DAMPs endógenos están las proteínas de choque térmico (HSPs), la proteína HMGB1 e incluso el DNA genómico y el ATP [34, 35]. También se ha visto que los TLRs activados en situaciones de isquemia/reperfusión inducen una rápida activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B con la subsecuente liberación de citoquinas pro-inflamatorias que van a jugar un papel importante en la disfunción ventricular originada tras el daño [36].

Estudios recientes han revelado que en modelos murinos, un déficit en TLR2 o TLR4 es capaz de reducir la inflamación cardíaca y el tamaño del infarto preservando la función ventricular tras un daño isquémico. Se ha visto que antagonistas de TLR2 [37] y TLR4 [38] son eficaces reduciendo la activación de NF- $\kappa$ B así como el tamaño del infarto, mejorando la función cardíaca en modelos murinos de IAM. Utilizando un modelo de IAM por ligación de la arteria coronaria, Shishido y cols. [39] demostraron que ratones knock-out (KO) para TLR2 presentaban una reducción significativa tanto en la tasa de mortalidad como en el remodelado cardíaco adverso. Estos datos indican que, en el contexto del daño cardíaco isquémico, la pérdida de la señalización cardíaca a través del receptor TLR2 es beneficiosa para la función cardíaca. Utilizando un modelo similar, Timmers y cols., demostraron que ratones KO para TLR4 mostraban menor remodelado ventricular así como una función cardíaca preservada tras IAM [40]. Otros TLRs han sido analizados en este contexto. Por ejemplo, se ha observado que la señalización a través de TLR3-TRIF es dañina durante isquemia/reperfusión cardíaca [41], y TLR9 parece jugar un papel protector en fases tempranas del IAM, aunque su estimulación tras el inicio de la isquemia no modifica el tamaño del infarto [42].

También se ha descrito que en modelos animales la activación de TLR2, TLR4 y TLR9 de forma previa a la inducción de I/R puede promover un menor tamaño del infarto y una mejora en la funcionalidad cardíaca a través de mecanismos de preconditionamiento [43]. Esos efectos protectores son mediados principalmente por la vía de PI3K/Akt, que previene la señalización apoptótica en los cardiomiocitos y reduce la respuesta inflamatoria en el corazón mediada por NF- $\kappa$ B [44]. Estos resultados señalan que el preconditionamiento podría ser considerado como una terapia alternativa para pacientes con IAM en el futuro.

### 2.1.2.2. Insuficiencia cardíaca

En alto porcentaje, los pacientes que sufren un IAM acaban desarrollando insuficiencia cardíaca (IC), que es un síndrome clínico complejo asociado al debilitamiento estructural y funcional del corazón, que pierde la capacidad de bombear la sangre de forma eficaz para cubrir las necesidades del organismo. La insuficiencia cardíaca es la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, afectando en la actualidad a millones de personas y con una incidencia que va en aumento [45].

La inflamación juega un papel crítico en la IC. Se sabe que los TLRs están implicados en este proceso de forma activa. Así, se ha descrito que TLR2 está sobreexpresado en modelos murinos de IC, tanto en cardiomiocitos como en células endoteliales vasculares y, por otro lado se ha descrito que la progresión de la IC es menor en ratones *Tlr2<sup>-/-</sup>* [39]. Recientemente se ha comprobado que las terapias inhibitorias basadas en el uso de anticuerpos anti-TLR2 son capaces de bloquear el desarrollo de fibrosis cardíaca inducida por angiotensina II, a través de la supresión del reclutamiento de macrófagos y mediante una disminución de la inflamación en el corazón [46]. Se ha observado que TLR4 está sobreexpresado en pacientes con IC crónica, lo que promueve la elevación de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias que favorece la progresión de la disfunción miocárdica y de la fibrosis [47, 48]. Además, el bloqueo farmacológico de TLR4 atenúa el daño miocárdico en situaciones de I/R así como el desarrollo de hipertrofia cardíaca [38]. También existen evidencias recientes que demuestran una implicación de TLR9 en IC. Este receptor puede ser activado por PAMPs endógenos incluyendo ADN mitocondrial [49]. De hecho, los niveles plasmáticos de DNA mitocondrial son más elevados en pacientes con IC y se asocian a una mayor mortalidad [49].

Con relación al papel de los TLRs en la modulación de la función cardíaca, la estimulación crónica de estos receptores puede llevar a la disfunción cardíaca, al menos en parte, a través de la modulación de la actividad de algunos canales iónicos. Se sabe que la homeostasis del ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) juega un papel fundamental regulando la función cardíaca [50]. De hecho, la contracción cardíaca está estrechamente regulada por cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Fallos en el manejo intracelular de este ion son la causa principal tanto de la disfunción cardíaca como de la aparición de arritmias en muchas cardiopatías. Cabe destacar que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un mediador clave en el proceso de excitación-contracción de las células cardíacas, que es el proceso que comienza con la excitación eléctrica del cardiomiocito des-

encadenando un potencial de acción que permitirá finalmente la contracción del órgano [50]. Específicamente, la fase de despolarización inicial del potencial de acción activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L presentes en el sarcolema, induciendo una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma. Esto produce la liberación de una gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico (SR) a través de los receptores de rianodina (RyR2), permitiendo la contracción celular. Posteriormente, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmáticos disminuyen gracias a dos mecanismos fundamentalmente, la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del SR a través de la bomba SERCA 2A y del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), favoreciendo la relajación celular [50].

En relación a este proceso, la activación de TLR2 por la proteína HSP70 en una línea celular de cardiomiocitos murinos tiene un efecto directo en la contracción celular [51]. Por otro lado, la activación a nivel cardíaco de TLR4 por lipopolisacárido (LPS) aumenta tanto el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  vía el NCX como la duración del potencial de acción, induciendo la aparición de procesos arritmogénicos [52]. Además, la citoquina inflamatoria HMGB1 puede inducir la activación de la NAD(P)H oxidasa a través de TLR4, promoviendo la liberación descontrolada de ROS lo que conlleva a un aumento del estrés oxidativo [53]. Cabe destacar que el estrés oxidativo es capaz de activar al RyR2 durante la diástole, debilitando tanto el proceso de contracción cardíaca, como la propia función del corazón. Por el contrario, la inhibición de TLR4 parece prevenir el desarrollo de esos eventos anormales, restaurando la capacidad contráctil del corazón y mejorando la funcionalidad cardíaca [54].

### 3. Receptores con dominio de oligomerización por unión de nucleótidos (NLR)

Los NLRs son sensores modulares citoplasmáticos de DAMPs y PAMPs y se pueden dividir en cuatro subfamilias en función de la configuración del dominio amino terminal: NLRA, NLRB/NAIP, NLRC y NLRP. Todos ellos tienen una estructura tripartita altamente conservada común a la familia NLR en humanos y consiste en un dominio amino terminal efector de unión (EBD), un dominio central NOD (o dominio NACHT) y un dominio carboxi-terminal de reconocimiento de ligando (LDR), el cual media la sensibilidad a ligandos intracelulares [55]. El dominio central NOD regula su auto-oligomerización, que es crucial para la activación de los efectores posteriores en la vía de señalización. El amino-terminal EBD media la unión a moléculas efectoras, las cuales determinan la vía de señalización final que se activará. En este sentido, el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) y el dominio pirina (PYD) median las interacciones proteína-proteína, que están asociadas a efectores de muerte celular. Otras proteínas NOD tienen un dominio heterofílico asociado a EBD como la proteína neuronal inhibidora de apoptosis (NAIP) o el transactivador MHC de clase II. Los principales activadores de los diferentes tipos de NLRs se especifican en la Tabla 2.

NLR		Activadores principales
NLRA	CIITA	IFN $\gamma$
NLRB	NAIP1/2	Inyectisoma
	NAIP5/6	Flagelina
NLRC	NOD1 (NLRC1)	Peptidoglicano iE-DAP
	NOD2 (NLRC2)	Peptidoglicano Muramil dipéptido ssRNA
	NLRC3	Sin determinar
	IPAF (NLRC4)	Inyectisoma/Flagelina (mediado por NAIPs)
	NLRC5	IFN $\gamma$ LPS Poly I:C
	NLRX1	LPS RNA viral
NLRP	NLRP1	Toxina letal del ántrax <i>Toxoplasma gondii</i> Agotamiento de ATP Muramil dipéptido
	NLRP2	LPS/TNF $\alpha$
	NLRP3	Eflujo de K <sup>+</sup> Toxinas bacterianas y RNA Nigericina Hidróxido de aluminio ATP Cristales de colesterol y de ácido úrico Partículas en suspensión Daño mitocondrial
	NLRP4	DNA/RNA viral
	NLRP5/8/13/14	Sin determinar
	NLRP6	RNA viral Ligandos de TLR Ácido lipoteicoico
	NLRP7	Lipoproteínas Bacterias aciladas ¿Proteasas lisosomale? ¿Flujo de K <sup>+</sup> ?
	NLRP9	dsRNA
	NLRP10	Activación de NOD1
	NLRP11	Ligandos de TLR4
	NLRP12	ATP Ligandos de TLR2 <i>Yersinia pestis</i>

Tabla 2. Clasificación de los distintos receptores tipo NOD identificados (NLRs) y sus principales activadores. ATP: Trifosfato de adenosina; CIITA: transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad clase II; iE-DAP: ácido  $\gamma$ -D-glutamyl-meso diaminopimélico; IFN: interferón; K: potasio; IPAF: factor de activación de proteasa convertidora de interleucina 1b (IL-1b); LPS: lipopolisacárido; NLR: receptores con dominio de oligomerización por unión de nucleótidos; NAIP: proteína 1 que contiene repeticiones IAP de baculovirus; NLRP: receptor con dominio de oligomerización por unión de nucleótidos, repeticiones ricas en leucina y dominio pirina; NOD1: proteína 1 con dominio de oligomerización por unión de nucleótidos; TNF: factor de necrosis tumoral.

## 2.1. Receptores con dominio de oligomerización por unión de nucleótidos, repeticiones ricas en leucina y dominios pirina (NLRP)

Recientemente, los receptores NLRP han incrementado su interés debido a su asociación con el inflamosoma. El inflamosoma es un complejo macroprotéico que interviene en la respuesta inflamatoria al mediar la activación de pro-caspasa-1. Una vez procesada, la caspasa-1 activa a su vez una serie de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , IL-18 y el HMGB1, aumentando la respuesta inflamatoria [56]. Además, la caspasa-1 también es capaz de iniciar la piroptosis, que es un tipo de muerte celular proinflamatoria mediada por la gasdermina D [57]. Así, la caspasa-1 procesa la gasdermina D y ésta forma un gran poro inespecífico en la membrana citoplasmática a través del cual se libera contenido intracelular y provoca la muerte celular [56, 57]. Por este poro se libera una gran cantidad de IL-1 $\beta$ , lo que fomenta la progresión de la reacción inflamatoria [56].

El inflamosoma se constituye a través de la oligomerización de tres proteínas esenciales: un PRR encargado de reconocer la señal concreta de activación; una proteína de tipo *speck* asociada a apoptosis con un dominio CARD (*apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*, PYCARD y normalmente denominada ASC) que sirve de almacén, y la pro-caspasa-1 [56, 58]. Hasta la fecha, se conocen cinco tipos de PRRs que pueden formar inflamosomas: NLRP1, NLRP3, NLRC1/NOD1, Pyrin y AIM2 [56].

### 3.1.1 El inflamosoma NLRP3

Unos de los subtipos de receptores NLR más estudiados en la actualidad en el contexto cardiovascular son los NLRP3. El proceso de activación del inflamosoma NLRP3 ocurre en dos etapas: un paso inicial de preparación, seguido del paso propio de activación del complejo. Durante la fase de preparación, la estimulación de determinados receptores por PAMPs y citoquinas específicas desencadena una señalización a través de NF- $\kappa$ B que induce la expresión de los distintos componentes del inflamosoma (NLRP3, ASC y pro-caspasa-1) y de sus dianas (principalmente pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18) [56]. En esta fase también se producen varias modificaciones postraduccionales como la fosforilación [59] y la desubiquitinación de NLRP3 [60], provocando cambios conformacionales en esta proteína que promueven el establecimiento del complejo macroprotéico. La etapa de activación involucra la formación del complejo y la activación de la pro-caspasa-1. En esta fase también se requiere una estimulación por patógenos o por las toxinas formadoras de poros o material particulado, o por indicadores de inestabilidad y daño celular como la disfunción mitocondrial, una excesiva producción de ATP, la movilización de cationes (salida de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>) y la ruptura de los lisosomas [56]. Como resultado, esta gran variedad de estímulos desencadena una salida masiva de K<sup>+</sup>, que se considera un proceso fundamental para la constitución del inflamosoma NLRP3 (Figura 1B) [61].

### 3.1.1.1. Papel del inflamosoma NLRP3 en la enfermedad cardiovascular

Duewell y cols., fueron los primeros en describir la importancia del inflamosoma NLRP3 en las CVDs al demostrar que los cristales de colesterol pueden activar este complejo en la patología aterosclerótica [62]. Estos datos apoyaban observaciones previas que sugerían que tanto IL-1 $\beta$  como IL-18 tienen un papel fundamental en la inflamación cardíaca [63]. Desde entonces, se ha confirmado que el inflamosoma NLRP3 y sus dianas representan uno de los principales mediadores de la inflamación deletérea responsable de numerosas alteraciones en las CVDs, siendo asociados a patologías como la hipertensión [64], la IC [65], la fibrilación auricular [66], la IAM [67] y la aterosclerosis [68].

#### 3.1.1.1.1. Implicación del inflamosoma NLRP3 en la aterosclerosis y en enfermedades vasculares

Desde su descubrimiento, se ha logrado caracterizar ampliamente la implicación de NLRP3 en la aterosclerosis, principalmente debido a que agentes pro-aterogénicos como los ácidos grasos libres, oxLDL y los cristales de colesterol son capaces de activarlo [62]. En el caso de los cristales de colesterol, se sabe que al no poder ser completamente fagocitados por los macrófagos, causan la desestabilización del lisosoma y la liberación de catepsina B, lo que a su vez induce la formación del complejo [62]. Del mismo modo, durante la aterogénesis se produce un incremento en la producción de ROS, la disfunción mitocondrial y el estrés del retículo endoplasmático (ER), contribuyendo a la preparación y activación del inflamosoma [69].

Tanto los componentes como las dianas del inflamosoma NLRP3 juegan un papel fundamental en el establecimiento de la aterosclerosis. Por ejemplo, los niveles de NLRP3, ASC, caspasa-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 están aumentados en las placas de ateroma, especialmente en las inestables [70]. No obstante, los datos obtenidos en modelos *in vivo* de aterosclerosis muestran datos contradictorios en este aspecto. Mientras que algunos estudios indican que la delección de los genes *Nlrp3*, *Asc*, *Casp1* o *Il1a/b* en ratones ateroscleróticos atenúa el desarrollo de lesiones [62, 71] y en general disminuye la gravedad de la enfermedad [72]; otros no encontraron cambios significativos en el establecimiento de aterosclerosis o el reclutamiento de macrófagos en ratones deficientes en estos genes [73]. Estos descubrimientos parecen depender considerablemente del tipo de modelo experimental de aterosclerosis (*Ldlr*<sup>-/-</sup> frente a *Apoe*<sup>-/-</sup>) así como del contenido de la dieta alta en grasa utilizada.

En cuanto a la patogénesis de otras enfermedades vasculares como el aneurisma aórtico abdominal, se ha comprobado que las aortas de estos enfermos muestran mayores niveles de expresión de *Nlrp3* e *Il1b* [74], y al inhibir esta citoquina o su receptor en ratones se logra preservar la estructura aórtica y reducir la inflamación vascular [75].

#### 3.1.1.1.2. Infarto agudo de miocardio

Varios estudios en modelos experimentales de daño por I/R demostraron que NLRP3, IL-1 $\beta$  e IL-18, así como la actividad

de caspasa-1 están aumentadas en el corazón isquémico [76]. Además, la delección o inhibición de NLRP3 redujo el tamaño de infarto y la gravedad del daño por I/R [76], disminuyó la infiltración de macrófagos y neutrófilos en el corazón [76], y atenuó la fibrosis cardíaca y la disfunción ventricular [77]. Se obtuvieron resultados similares en ratones deficientes en *Asc* o *Casp1*, que además también demostraron menores niveles de IL-1 $\beta$  [78].

Toldo y cols., sugieren que la isquemia que ocurre durante el IAM provoca un daño mitocondrial que sirve de señal para la preparación del inflamosoma, mientras que la generación de ROS que ocurre en la etapa consecutiva de reperfusión es la que actúa de señal activadora [79]. Varios estudios que evaluaron compuestos antioxidantes en modelos de daño por I/R concluyeron que al tratar antes o en el momento de la reperfusión, disminuye considerablemente el tamaño del infarto y los niveles de NLRP3, caspasa-1 e IL-1 $\beta$ , apoyando la hipótesis de la relación entre la producción de ROS y la activación del inflamosoma en la patología isquémica [80].

Con base en los resultados experimentales, se diseñaron varios ensayos clínicos para analizar los posibles efectos terapéuticos del bloqueo de la cascada inflamatoria de NLRP3 en pacientes con IAM. Estos estudios usaron el anakinra, un antagonista recombinante del receptor de IL-1 $\beta$  [81], y canakinumab, un anticuerpo monoclonal frente a IL-1 $\beta$ , respectivamente [63]. Ambos fármacos mostraron resultados favorables, siendo capaces de disminuir el riesgo cardiovascular, aunque se requiere investigación adicional para determinar la dosis efectiva y para reducir los efectos adversos asociados [63, 81].

### 3.1.1.1.3. Insuficiencia cardíaca

El papel de NLRP3 en la fisiopatología de la IC es un campo emergente, y de hecho solo algunos estudios han descrito que tanto IL-1 $\beta$  [82, 83] como la IL-18 [84] están aumentadas a nivel cardíaco y plasmático en pacientes con IC. Concretamente, tanto los cardiomiocitos como los macrófagos y las células endoteliales poseen mayores niveles de expresión de IL-18 en estos pacientes [84]. En resumen, el inflamosoma/NLRP3 se encuentra íntimamente asociado a la inflamación y remodelado adverso que ocurren en el corazón y que acaban provocando la disfunción cardíaca y la IC [85]. Estos datos indican que el complejo del inflamosoma representa una nueva diana terapéutica para el tratamiento de múltiples CVDs y supone el descubrimiento de mecanismos novedosos implicados en la regulación de la función cardíaca.

Como mencionamos anteriormente, tanto la función cardíaca como la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> están estrechamente relacionadas a nivel cardíaco. Además, la señalización por Ca<sup>2+</sup> es un regulador clave en la activación del inflamosoma/NLRP3 [86]. De hecho, la administración de activadores del receptor sensor de Ca<sup>2+</sup> (CaSR), un receptor acoplado a proteínas G [87] implicado en la liberación de Ca<sup>2+</sup> de las reservas del RE y por tanto, implicado en la activación de NLRP3, activa la vía de señalización de la fosfolipasa C (PLC) en macrófagos derivados de la médula ósea en ratón. Esto conduce a la acumulación de fosfato de inositol y a la liberación de Ca<sup>2+</sup> de las reservas del RE, aumentando el Ca<sup>2+</sup>

intracelular que activa NLRP3 [88]. Además, se ha demostrado que la administración de un activador de CaSR induce fibrosis miocárdica en ratas Wistar [89]. En línea con la idea de que la señalización de Ca<sup>2+</sup> está implicada en la activación del inflamosoma, la activación constitutiva de NLRP3 en los cardiomiocitos aumenta la expresión de RyR2, lo que conduce a un aumento de los eventos pro-arritmogénicos de liberación de Ca<sup>2+</sup> del SR [66]. Por el contrario, la delección genética de *Nlrp3* reduce la incidencia de episodios de fibrilación auricular [90].

### 3.2. Dominio de oligomerización de nucleótidos tipo I (NOD1)

Al comienzo de los años 2000 se descubrieron dos moléculas que contenían el dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD), NOD1 y NOD2, en búsquedas dentro de bases de datos de un análogo del regulador de la apoptosis, Apaf-1 [91]. Desde entonces, la familia de los NOD se ha ido ampliando y comprende más de veinte proteínas humanas junto con un gran número de proteínas animales, vegetales, bacterianas y fúngicas [91].

NOD1 codifica una proteína intracelular de andamiaje/soporte que consiste en dominios CARD, NOD y LRR (Figura 1). NOD1 se presenta como un monómero inactivo en el citoplasma y tras el reconocimiento del ligando, experimenta un cambio conformacional que promueve su activación. Una vez activado, NOD1 se auto-oligomeriza y recluta al receptor de interacción de proteína serina/treonina quinasa 2 (RIPK2) a través de interacciones homólogas CARD-CARD [92]. RIPK2 media posteriormente el reclutamiento y activación de la serina/treonina quinasa TAK1 que a su vez, activa el complejo IKK y la vía de MAPK. Después, IKK fosforila al inhibidor de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , el cual libera a NF- $\kappa$ B permitiendo su translocación al núcleo y modulando la expresión de genes diana posteriores en la vía de señalización (Figura 1C) [93].

NOD1 detecta principalmente el ácido D-glutamil-meso-diaminopilemico (DAP), un dipéptido de peptidoglicanos presentes principalmente en bacterias Gram negativas, pero también en grupos específicos de bacterias Gram positivas. Sin embargo, la traducción de la señal de NOD1 también puede estimularse en ausencia de infección directa de un patógeno bacteriano. Es más, Keestra-Gounder y cols., han demostrado recientemente que las respuestas proinflamatorias inducidas por estrés del ER están mediadas a través de las vías de NOD1/NOD2 [94], sugiriendo un papel potencial de NOD1 en las enfermedades inflamatorias asociadas con este trastorno.

El enlace entre NOD1 y el estrés en el ER parece ser la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), ya que la inhibición de IRE1 $\alpha$ , una quinasa implicada en esta vía, atenúa la reacción inflamatoria asociada a NOD1 [94]. Algunos estudios han asociado el estrés del ER con alteraciones en los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> y la activación de la señalización de NOD1 [95, 96]. Un estudio muy reciente ha revelado que la activación de NOD1 tanto por patógenos bacterianos como por el ligando de NOD1, C12-iE-DAP, induce la activación de la UPR por la quinasa del ER PERK, así como por el flujo de Ca<sup>2+</sup> desde el canal de Ca<sup>2+</sup> de la membrana del ER activado por IP<sub>3</sub>, el cual exacerba la respuesta inflamatoria mediante la vía de la señalización de NOD1 [95]. Estas evidencias demuestran la relación entre la activación de NOD1

yla alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  celular, sugiriendo que la vía inflamatoria de NOD1 podría ser responsable de múltiples patologías cardíacas, en parte, a través de su participación en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

### 3.2.1. Papel de NOD1 en aterosclerosis y otras enfermedades vasculares

El endotelio representa la primera barrera contra los PAMPs bacterianos de la sangre y así mismo, es un componente importante de la respuesta del sistema inmune innato a los patógenos. Moreno y cols., descubrieron que NOD1 se expresa selectivamente en músculo liso vascular y su activación desencadena la expresión de los mediadores inflamatorios NOS2 y COX2 [97]. De la misma forma, los ligandos específicos de NOD1 pueden activar respuestas inflamatorias *in vitro* en vasos humanos intactos [98], e induce un número significativo de respuestas proinflamatorias en las células endoteliales, apuntando a NOD1 como un socio clave en las enfermedades vasculares [98].

La migración y proliferación de las células de músculo liso vascular (VMSCs) que ocurre en la aterosclerosis, contribuye a la inflamación vascular a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias. La patogénesis de la diabetes *mellitus* acelera estos eventos vasculares ateroscleróticos, los cuales se han relacionado con vías de señalización del sistema inmune innato mediadas por NOD. De hecho, VMSCs aórticos humanos tratados con insulina o con el activador selectivo de este receptor, iE-DAP muestran un aumento de la expresión de NOD1 junto con el aumento de los niveles de IL-8 y IL-1 $\beta$  [99].

En relación con el papel de NOD1 en la aterosclerosis, Kanno y cols., demostraron por primera vez que la administración oral a largo plazo de un ligando sintético de NOD1 acelera el desarrollo y progresión de la aterosclerosis en ratones *Apoe*<sup>-/-</sup> [100]. Además, la pérdida completa de NOD1 disminuye significativamente el tamaño de las lesiones ateroscleróticas, proporcionando una evidencia robusta de la relación entre NOD1 y la progresión de la aterosclerosis [100]. También, la expresión de NOD1 está aumentada en células endoteliales de placas ateroscleróticas humanas y murinas, y la expresión endotelial de la molécula de adhesión VCAM-1 está reducida en las lesiones de ateroma en modelos murinos *Nod1*<sup>-/-</sup> *Apoe*<sup>-/-</sup> comparado con *Apoe*<sup>-/-</sup> [101]. Es más, el tratamiento de células endoteliales de ratones *Apoe*<sup>-/-</sup> con el inhibidor farmacológico de NOD1 previene el aumento de expresión de VCAM-1 [101], sugiriendo un papel crucial de NOD1 en el comienzo de la aterosclerosis.

### 3.2.2. Implicación de NOD1 en enfermedades cardíacas: infarto de miocardio agudo e insuficiencia cardíaca

Se ha descrito que alteraciones en la activación de NOD1 participa en diversas enfermedades cardíacas, como es el caso de la insuficiencia cardíaca [102] y la cardiomiopatía diabética [103]. Recientemente, Yang y cols., demostraron que la activación de NOD1 con DAP (un activador sintético de NOD1) agravaba significativamente el daño cardíaco inducido por I/R en ratones, y

potenciaba la apoptosis e inflamación del cardiomiocito [104]. En la misma línea, Delgado y cols., demostraron que la activación de NOD1 en ratones promovía una disminución significativa de la función cardíaca [105]. Además, es importante señalar que NOD1 es funcional en los cardiomiocitos. En ese sentido, se ha observado que los cardiomiocitos aislados de ratones tratados con iE-DAP muestran una disminución de la densidad de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L ( $I_{\text{CaL}}$ ), transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular disminuidos y un enlentecimiento de la cinética de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual correlaciona con una expresión reducida de SERCA [105]. Todas estas alteraciones se observan en numerosas patologías cardíacas como es el caso de la IC. Además, las alteraciones en el manejo intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico se asociaban a un mayor número de eventos diastólicos, como por ejemplo el aumento de la frecuencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y la ocurrencia de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo todas estas alteraciones no se observaron en los cardiomiocitos aislados de ratones KO para NOD1 [105].

La eliminación genética de NOD1 o su inhibición farmacológica también previene las alteraciones del manejo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  asociado con IC en células ventriculares. En este contexto, Val Blasco y cols., demostraron que la eliminación de NOD1 en un modelo murino de IC mejora la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  sistólica y la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  del SR y previene la ocurrencia de eventos pro-arritmogénicos en un modelo de ratón con IC [102]. Además, la eliminación de NOD1 también previene las alteraciones de la respuesta  $\beta$ -adrenérgica en la dinámica intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  en cardiomiocitos de ratones con IC [106]. En conjunto, NOD1 podría resultar un nuevo regulador de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  ya que es capaz de modular el proceso de acoplamiento de excitación-contracción, y puede ser el punto de partida de una nueva línea de investigación acerca de las alteraciones del manejo intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  en distintas patologías cardíacas [103, 104].

## 4. Conclusiones

En el presente capítulo se resumen los hallazgos más relevantes relacionados con el papel de los PRRs en el progreso de las enfermedades cardiovasculares más prevalentes. En este sentido, tanto los TLRs como los NLRs tienen una implicación clara en el desarrollo de algunas enfermedades cardiovasculares, tales como la aterosclerosis, el IAM o la IC. Todas o la mayoría de estas acciones están mediadas por células inmunes, pero también por cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales y vasculares, lo que señala a las células cardiovasculares como posibles nuevas dianas para las acciones de TLRs y NLRs. La activación sostenida de TLR2/4, NLRP3 o NOD1 está ampliamente relacionada con un remodelado cardíaco deletéreo, al promover el progreso de los procesos ateroscleróticos, principalmente mediante la inducción de mediadores proinflamatorios. Por el contrario, la inhibición específica o la delección genética de estos PRRs previenen el daño cardiovascular en la mayoría de las enfermedades cardiovasculares. En consecuencia, el desarrollo de nuevas estrategias específicas destinadas a reducir la sobre-activación de los PRRs en estas patologías abre un nuevo campo en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

## Referencias

- [1] Matzinger, P., Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology* 1994; 12: 991–1045.
- [2] Hayden, M. S., West, A. P., Ghosh, S., NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 2006; 25: 6758–80.
- [3] Takeuchi, O., Akira, S., Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805–20.
- [4] Zhang, Y., Huang, Z., Li, H., Insights into innate immune signalling in controlling cardiac remodelling. *Cardiovascular Research*, 2017; 113: 1538-1550.
- [5] Mann, D. L., Innate immunity and the failing heart. *Circulation Research* 2015; 116: 1254–68.
- [6] Vidya, M. K., Kumar, V. G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Bhatta, R., Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *International reviews of immunology* 2018; 37: 20–36.
- [7] Majer, O., Liu, B., Barton, G. M., Nucleic acid-sensing TLRs: trafficking and regulation. *Current opinion in immunology* 2017; 44: 26–33.
- [8] Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., Toll-like receptors. *Annual review of immunology* 2003; 21: 335–76.
- [9] Kawai, T., Akira, S., The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology*, 2010; 11: 373–384.
- [10] Deguine, J., Barton, G. M., MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000prime reports* 2014; 6: 97.
- [11] Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. N., Martin, M., TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of dental research* 2011; 90: 417–27.
- [12] Ospelt, C., Gay, S., TLRs and chronic inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010; 42: 495–505.
- [13] Mitchell, J. A., Ryffel, B., Quesniaux, V. F. J., Cartwright, N., Paul-Clark, M., Role of pattern-recognition receptors in cardiovascular health and disease. *Biochemical Society transactions* 2007; 35: 1449–52.
- [14] Bäck, M., Hansson, G. K., Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. *Nature reviews. Cardiology* 2015; 12: 199–211.
- [15] Bäck, M., Omega-3 fatty acids in atherosclerosis and coronary artery disease. *Future science OA* 2017; 3: FSO236.
- [16] Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V. Z., Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2010; 74: 213–20.
- [17] Endo, A., A gift from nature: the birth of the statins. *Nature medicine* 2008; 14: 1050–2.
- [18] Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G., Yan, Z., Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; 105:1158-61.
- [19] Katsargyris, A., Klonaris, C., Tsiodras, S., Bastounis, E., Giannopoulos, A., Theocharis, S., Statin treatment is associated with reduced toll-like receptor 4 immunohistochemical expression on carotid atherosclerotic plaques: a novel effect of statins. *Vascular* 2011; 19: 320–6.
- [20] Michelsen, K. S., Wong, M. H., Shah, P. K., *et al.* Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101: 10679–84.
- [21] Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wikinson, K., *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* 2010; 11: 155–61.
- [22] Kazemi, M. R., McDonald, C. M., Shigenaga, J. K., Grunfeld, C., Feingold, K. R., Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005; 25: 1220–4.
- [23] De Graaf, R., Kloppenburg, G., Kitslaar, P. J. H. M., Bruggeman, C. A., Stassen, F., Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through toll-like receptors 2 and 4. *Microbes and infection* 2006; 8: 1859–65.
- [24] Curtiss, L. K., Black, A. S., Bonnet, D. J., Tobias, P. S., Atherosclerosis induced by endogenous and exogenous toll-like receptor (TLR)1 or TLR6 agonists. *Journal of lipid research* 2012; 53: 2126–32.
- [25] Goulopoulou, S., McCarthy, C. G., Webb, R. C., Toll-like receptors in the vascular system: sensing the dangers within. *Pharmacological reviews* 2016; 68: 142–67.
- [26] Yang, Y., Ma, Z., Yang, G. *et al.* Alginate oligosaccharide indirectly affects toll-like receptor signaling via the inhibition of microRNA-29b in aneurysm patients after endovascular aortic repair. *Drug design, development and therapy* 2017; 11: 2565–79.
- [27] Hernanz, R., Martínez-Revelles, S., Palacios, R., *et al.* Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *British journal of pharmacology* 2015; 172: 3159–76.
- [28] McCarthy, C. G., Wenceslau, C. F., Goulopoulou, S., *et al.* Circulating mitochondrial DNA and toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular research* 2015; 107: 119–30.
- [29] Adamczak, D. M., The role of toll-like receptors and vitamin D in cardiovascular diseases-a review. *International journal of molecular sciences* 2017; 18: 2252.
- [30] Yan, H., Cui, B., Zhang, X., *et al.* Antagonism of toll-like receptor 2 attenuates the formation and progression of abdominal aortic aneurysm. *Acta pharmaceutica Sinica. B* 2015; 5: 176–87.
- [31] Jabłońska, A., Neumayer, C., Bolliger, M., *et al.* Analysis of host toll-like receptor 3 and RIG-I-like receptor gene expression in patients with abdominal aortic aneurysm. *Journal of vascular surgery* 2018; 68: 39S-46S.
- [32] Jayaraj, C., Davatyan, K., Chadwick, J., Epidemiology of myocardial infarction. In: Burak Pamukçu (Acibadem Mehmet Ali Aydinlar University), ed. *Myocardial Infarction*. IntechOpen, 2018: 9–19.
- [33] Hausenloy, D. J., Yellon, D. M., Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *Journal of clinical investigation*, 2013; 123:92-100.

- [34] Valen G, Hansson GK, Dumitrescu A, Vaage J. Unstable angina activates myocardial heat shock protein 72, endothelial nitric oxide synthase, and transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Cardiovascular research* 2000; 47: 49–56.
- [35] Amanvermez, R., Acar, E., Günay, M., Baydın, A., Yardan, T., Bek, Y., Hsp 70, hsCRP and oxidative stress in patients with acute coronary syndromes. *Bosnian journal of basic medical sciences* 2012; 12: 102–7.
- [36] Chen, H., Zhang, R-Q., Wei, X-G., Ren, X-M., Gao, X-Q., Mechanism of TLR-4/NF-κB pathway in myocardial ischemia reperfusion injury of mouse. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 2016; 9: 503–7.
- [37] Arslan, F., Smeets, M. B., O'Neill, L. A. J., *et al.* Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation* 2010; 121: 80–90.
- [38] Shimamoto, A., Chong, A. J., Yada, M. *et al.* Inhibition of toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2006; 114: I270-4.
- [39] Shishido, T., Nozaki, N., Yamaguchi, S., *et al.* Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108: 2905–10.
- [40] Timmers, L., Sluijter, J. P. G., Van Keulen, J. K., *et al.* Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circulation Research* 2008; 102: 257–64.
- [41] Chen, C., Feng, Y., Zou, L., *et al.* Role of extracellular RNA and TLR3-Trif signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of the american heart association* 2014; 3: e000683.
- [42] Ohm, I. K., Gao, E., Belland Olsen, M., *et al.* Toll-like receptor 9-activation during onset of myocardial ischemia does not influence infarct extension. *PloS one* 2014; 9: e104407.
- [43] Dong, J-W., Vallejo, J. G., Tzeng, H-P., Thomas, J. A., Mann, D. L., Innate immunity mediates myocardial preconditioning through Toll-like receptor 2 and TIRAP-dependent signaling pathways. *American journal of physiology-heart and circulatory physiology* 2010; 298: H1079–87.
- [44] Cao, Z., Ren, D., Ha, T., *et al.* CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury: involving activation of PI3K/Akt signaling. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1832: 96–104.
- [45] Savarese, G., Lund, L. H., Global public health burden of heart failure. *Cardiac Failure Review* 2017; 03: 7.
- [46] Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: a journey from molecular to nano therapeutics. *Frontiers in physiology* 2017; 8: 508.
- [47] Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y-D., *et al.* Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 104: 271–80.
- [48] Birks, E. J., Felkin, L. E., Banner, N. R., Khaghani, A., Barton, P. J., Yacoub, M. H., Increased toll-like receptor 4 in the myocardium of patients requiring left ventricular assist devices. *The journal of heart and lung transplantation* 2004; 23: 228–35.
- [49] Oka, T., Hikoso, S., Yamaguchi, O *et al.*, Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* 2012; 485: 251–5.
- [50] Bers, D. M., Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 2002; 415: 198–205.
- [51] Mathur, S., Walley, K.,R., Wang, Y., Indrambarya, T., Boyd, J. H., Extracellular heat shock protein 70 induces cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction via TLR2. *Circulation Journal* 2011; 75: 2445–52.
- [52] Milberg, P., Pott, C., Fink, M., *et al.*, Inhibition of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger suppresses torsades de pointes in an intact heart model of long QT syndrome-2 and long QT syndrome-3. *Heart rhythm* 2008; 5: 1444–52.
- [53] Fan, J., Li, Y., Levy, R. M., *et al.* Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: Role of HMGB1-TLR4 signaling. *The journal of immunology* 2007; 178: 6573–80.
- [54] Zhang, C., Mo, M., Ding, W., *et al.* High-mobility group box 1 (HMGB1) impaired cardiac excitation–contraction coupling by enhancing the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup> leak through TLR4–ROS signaling in cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2014; 74: 260–73.
- [55] Franchi, L., Munoz-Planillo, R., Nunez, G., Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat. Immunol.* 2012; 13: 325–32.
- [56] He, Y., Hara, H., Núñez, G., Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends in biochemical sciences*, 2016;12: 1012-1021.
- [57] Ramos-Junior, E. S., Morandini, A. C., Gasdermin: A new player to the inflammasome game. *Biomedical journal* 2017; 40: 313–6.
- [58] Mangan, M. S. J., Olhava, E. J., Roush, W. R., Seidel, H. M., Glick, G. D., Latz, E., Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nature reviews drug discovery*, 2018; 17: 588–606.
- [59] Song, N., Liu, Z-S., Xue, W., *et al.*, NLRP3 Phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation. *Molecular cell* 2017; 68: 185-197.e6.
- [60] Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., Alnemri, E. S., Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *The journal of biological chemistry* 2012; 287: 36617–22.
- [61] Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M., Núñez, G., K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 2013; 38: 1142–53.
- [62] Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; 464: 1357–61.
- [63] Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., *et al.* Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *New England journal of medicine* 2017; 377: 1119–31.
- [64] Krishnan, S. M., Sobey, C. G., Latz, E., Mansell, A., Drummond, G. R., IL-1β and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension? *British journal of pharmacology* 2014; 171: 5589–602.

- [65] Van Tassell, B. W., Raleigh, J. M. V., Abbate, A., Targeting interleukin-1 in heart failure and inflammatory heart disease. *Current heart failure reports* 2015; 12: 33–41.
- [66] Yao C, Veleva T, Scott L *et al.*, Enhanced cardiomyocyte NLRP3 inflammasome signaling promotes atrial fibrillation. *Circulation* 2018; 138: 2227–42.
- [67] Wang, L., Qu, P., Zhao, J., Chang, Y., NLRP3 and downstream cytokine expression elevated in the monocytes of patients with coronary artery disease. *Archives of medical science : AMS* 2014; 10: 791–800.
- [68] Karasawa, T., Takahashi, M., Role of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2017; 24: 443–51.
- [69] Liu, D., Zeng, X., Li, X., Mehta, J. L., Wang, X., Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Basic research in cardiology* 2018; 113: 5.
- [70] Paramel Varghese, G., Folkersen, L., Strawbridge, R. J., *et al.*, NLRP3 Inflammasome expression and activation in human atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association* 2016; 5:e003031.
- [71] Gage, J., Hasu, M., Thabet, M., Whitman, S. C., Caspase-1 deficiency decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *The canadian journal of cardiology* 28: 222–9.
- [72] Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., *et al.*, Lack of interleukin-1 $\beta$  decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 656–60.
- [73] Menu, P., Pellegrin, M., Aubert, J-F, *et al.*, Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome. *Cell death & disease* 2011; 2: e137.
- [74] Gonzalez-Hidalgo, C., De Haro, J., Bleda, S., Cañibano, C., Michel, I., Acin, F., Differential mRNA expression of inflammasome genes NLRP1 and NLRP3 in abdominal aneurysmal and occlusive aortic disease. *Therapeutic advances in cardiovascular disease* 2018; 12: 123–9.
- [75] Johnston, W. F., Salmon, M., Pope, N. H., *et al.*, Inhibition of interleukin-1 $\beta$  decreases aneurysm formation and progression in a novel model of thoracic aortic aneurysms. *Circulation* 2014; 130: S51-9.
- [76] Liu, Y., Lian, K., Zhang, L., *et al.*, TXNIP mediates NLRP3 inflammasome activation in cardiac microvascular endothelial cells as a novel mechanism in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic research in cardiology* 2014; 109: 415.
- [77] van Hout, G. P. J., Bosch, L., Ellenbroek, G. H. J. M., *et al.*, The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *European heart journal* 2017; 38: 828–36.
- [78] Kawaguchi, M., Takahashi, M., Hata, T., *et al.*, Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2011; 123: 594–604.
- [79] Toldo, S., Marchetti, C., Mauro, A. G., *et al.*, Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia–reperfusion in the mouse. *International journal of cardiology* 2016; 209: 215–20.
- [80] Sun, W., Lu, H., Lyu, L., *et al.*, Gastrodin ameliorates microvascular reperfusion injury-induced pyroptosis by regulating the NLRP3/caspase-1 pathway. *Journal of physiology and biochemistry* 2019; 75:531-547.
- [81] Van Tassell, B. W., Lipinski, M. J., Appleton, D., *et al.*, Rationale and design of the Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial-3 (VCU-ART3): A randomized, placebo-controlled, double-blinded, multicenter study. *Clinical cardiology* 2018; 41: 1004–8.
- [82] Szekeley, Y., Arbel, Y., A review of interleukin-1 in heart disease: where do we stand today? *Cardiology and therapy* 2018; 7: 25–44.
- [83] Van Tassell, B. W., Arena, R. A., Toldo, S., *et al.*, Enhanced interleukin-1 activity contributes to exercise intolerance in patients with systolic heart failure. *PLoS one* 2012; 7.
- [84] Mallat, Z., Heymes, C., Corbaz, A., *et al.*, Evidence for altered interleukin 18 (IL)-18 pathway in human heart failure. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004; 18: 1752–4.
- [85] Butts, B., Gary, R. A., Dunbar, S. B., Butler, J., The importance of NLRP3 inflammasome in heart failure. *Journal of cardiac failure* 2015; 21: 586–93.
- [86] Horng, T., Calcium signaling and mitochondrial destabilization in the triggering of the NLRP3 inflammasome. *Trends in immunology* 2014; 35: 253–61.
- [87] Brown, E. M., Gamba, G., Riccardi, D., *et al.* Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366: 575–80.
- [88] Lee, G. S., Subramanian N, Kim AI *et al.*, The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Nature*, 2012; 7427:123-7.
- [89] Lu, F-H, Fu, S-B, Leng, X., *et al.*, Role of the calcium-sensing receptor in cardiomyocyte apoptosis via the sarcoplasmic reticulum and mitochondrial death pathway in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cellular physiology and biochemistry* 2013; 31: 728–43.
- [90] Chen, G., Chelu, M. G., Dobrev, D., Li, N., Cardiomyocyte inflammasome signaling in cardiomyopathies and atrial fibrillation: mechanisms and potential therapeutic implications. *Frontiers in physiology* 2018; 9: 1115.
- [91] Inohara, N., Núñez, G., The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 2001; 20: 6473–81.
- [92] Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., *et al.*, Nod1, an apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- $\kappa$ B. *Journal of biological chemistry* 1999; 274: 14560–7.
- [93] Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., Núñez, G., NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity* 2014; 41: 898–908.
- [94] Keestra-Gounder, A. M., Byndloss, M. X., Seyffert, N., *et al.*, NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature* 2016; 532: 394–7.
- [95] Mendez, J. M., Kolora, L. D., Lemon, J. S., Dupree, S. L., Keestra-Gounder, A. M., Activation of the endoplasmic reticulum stress response impacts the NOD1 signaling pathway. *Infection and immunity* 2019; 87 :e00826-18.
- [96] Molinaro, R., Mukherjee, T., Flick, R., Philpott, D. J., Girardin, S. E., Trace levels of peptidoglycan in serum underlie the NOD-dependent cytokine response to endoplasmic reticulum stress. *Journal of biological chemistry* 2019; 294: 9007–15.
- [97] Moreno, L., McMaster, S., Gatheral, T. *et al.* Nucleotide oligomerization domain 1 is a dominant pathway for NOS2 induction

in vascular smooth muscle cells: Comparison with Toll-like receptor 4 responses in macrophages. *British journal of pharmacology* 2010; 160: 1997–2007.

[98] Navarro, R., Delgado-Wicke, P., Nuñez-Prado, N., *et al.*, Role of nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) in pericyte-mediated vascular inflammation. *Journal of cellular and molecular medicine* 2016; 20: 980–6.

[99] Shiny, A., Regin, B., Mohan, V., Balasubramanyam, M., Coordinated augmentation of NFAT and NOD signaling mediates proliferative VSMC phenotype switch under hyperinsulinemia. *Atherosclerosis* 2016; 246: 257–66.

[100] Kanno, S., Nishio, H., Tanaka, T., *et al.*, Activation of an innate immune receptor, Nod1, accelerates atherogenesis in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice. *The Journal of Immunology* 2015; 194: 773–80.

[101] González-Ramos, S., Paz-García, M., Rius, C., *et al.*, Endothelial NOD1 directs myeloid cell recruitment in atherosclerosis through VCAM-1. *The FASEB Journal* 2019; 33: 3912–21.

[102] Val-Blasco, A., Piedras, M. J. G. M., Ruiz-Hurtado, G., *et al.*, Role of NOD1 in heart failure progression via regulation of Ca<sup>2+</sup> handling. *Journal of the American college of cardiology* 2017; 69: 423–33.

[103] Prieto, P., Vallejo-Cremades, M. T., Benito, G., *et al.*, NOD1 receptor is up-regulated in diabetic human and murine myocardium. *Clinical science* (London, England : 1979) 2014; 127: 665–77.

[104] Activation of NOD1 by DAP contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via multiple signaling pathways. *Apoptosis* 2015; 20: 512–522

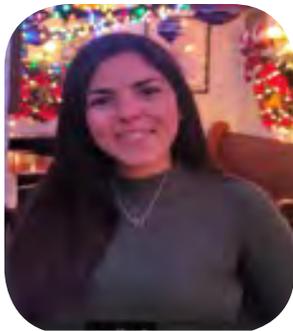
[105] Delgado, C., Ruiz-Hurtado, G., Gómez-Hurtado, N., *et al.*, NOD1, a new player in cardiac function and calcium handling. *Cardiovascular research* 2015; 106: 375–86.

[106] Val-Blasco, A., Navarro-García, J. A., Tamayo, M., *et al.*, Deficiency of NOD1 Improves the  $\beta$ -adrenergic modulation of Ca<sup>2+</sup> handling in a mouse model of heart failure. *Frontiers in Physiology* 2018; 9: 702.



### MARÍA FERNÁNDEZ VELASCO

Investigadora Titular del Sistema Nacional de Salud español, lidera su propio grupo, con una línea de investigación centrada en el estudio de nuevos mecanismos en la enfermedad cardiovascular. Tiene más de quince años de experiencia trabajando en el campo propuesto, cuenta con artículos publicados en las Revistas Internacionales más relevantes (e. g., *JACC*, *Circulation*, *Cir Res*, *Cardiovasc Res*, *Autophagy*, entre otras). La doctora Fernández adquirió toda esta experiencia en el campo propuesto durante su formación doctoral en España y en el extranjero (Estados Unidos, Canadá, Italia y Francia). Elaboró su tesis doctoral bajo la supervisión de la doctora C. Delgado (Madrid, España) se centró en el estudio de mecanismos novedosos en la hipertrofia cardíaca experimental. Durante este tiempo, adquirió valiosos conocimientos durante una estancia corta en el grupo del doctor D. Difrancesco (Milán, Italia), experto en mecanismos arritmogénicos, especialmente en el nodo sinoauricular. Pasó tres meses en el laboratorio del doctor S. Nattel (Montreal, Canadá), clínico y reconocido experto en el campo de la miopatía auricular y la fibrilación auricular. Para su formación posdoctoral, estuvo dos años y medio en el grupo del doctor AM Gómez (Montpellier, Francia), trabajando en nuevos mecanismos de la insuficiencia cardíaca y la arritmogénesis. Su segunda estancia posdoctoral la realizó en el laboratorio del doctor L Boscá (Madrid, España), líder en el campo de la inflamación. Aquí, la doctora Fernández participó en varios proyectos relacionados con el papel de la respuesta inflamatoria en las enfermedades cardiovasculares. En 2019, pasó tres meses en el laboratorio del doctor G. Nuñez (Michigan, Estados Unidos), uno de los descubridores del receptor de inmunidad innata NOD1. En la actualidad, está centrada en determinar si nuevos mediadores del sistema inmune innato están implicados en la progresión de varias enfermedades cardiovasculares. En este sentido, fue pionera en el estudio del papel de NOD1 en el corazón sano y enfermo.





# Efecto cardioprotector de la vitamina D en la insuficiencia cardíaca

María Tamayo,<sup>1</sup> Laura Martín-Nunes,<sup>1</sup> María José Piedras<sup>2</sup> y Carmen Delgado<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid, España

<sup>2</sup> Universidad Francisco de Vitoria, facultad de Medicina, Madrid, España

\* Autor para correspondencia:

Carmen Delgado Canencia

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid, España.

Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, España

email: cdelgado@iib.uam.es

**Resumen:** La vitamina D es una prohormona cuya función más conocida es mantener la homeostasis del calcio y del fósforo en el organismo. Hoy en día sabemos que la unión del metabolito activo de la vitamina D, 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitriol (calcitriol) a su receptor nuclear de vitamina D, es capaz de regular la expresión, no solo de genes relacionados con el metabolismo mineral sino también de genes implicados en procesos relevantes para el sistema cardiovascular como la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis, el estrés oxidativo, el transporte de membrana, la homeostasis de la matriz extracelular o la adhesión celular, entre otros. La insuficiencia cardíaca (IC) supone la tercera causa de muerte de origen cardiovascular. Entre los pacientes con IC la prevalencia del déficit de vitamina D es elevada, relacionándose este hallazgo con un peor pronóstico y una mayor mortalidad. La suplementación con vitamina D podría tener un efecto beneficioso ya que los estudios experimentales han demostrado una amplia variedad de mecanismos a través de los cuales la vitamina D tendría un efecto protector en la IC. Estos incluyen, la regulación de la activación del SRAA, la reducción de la hipertrofia y la fibrosis cardíaca, la modulación del remodelado eléctrico adverso y la mejora de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular en el corazón. Además, la vitamina D ha demostrado propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Sin embargo, los estudios clínicos publicados hasta la fecha sobre el papel de la suplementación con vitamina D en el tratamiento de la IC no han sido concluyentes y habrá que esperar los resultados de futuros ensayos clínicos prospectivos para poder recomendar de forma rutinaria la suplementación de vitamina D para la prevención o el tratamiento de la IC.

## Abreviaturas

15-PGDH	Deshidrogenasa 15-hidroxi prostaglandina
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANP	Péptido natriurético auricular
ARNm	ARN mensajero
CYP27B1	1 $\alpha$ -hidroxilasa
CYP24A1	24-hidroxilasa
ECC	Acoplamiento excitación-contracción cardíaco
ECG	Electrocardiograma
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FE	Fracción de eyección
FGF23	Factor de crecimiento de fibroblastos 23
IC	Insuficiencia cardíaca
IL	Interleuquina
INF- $\gamma$	Interferón- $\gamma$
LTCC	Canales de Ca <sup>2+</sup> tipo L
MCP-1	Proteína quimiotáctica de macrófagos-1
MEC	Matriz extracelular
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear <i>kappa</i> de las células B activadas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Potencial de acción
PAI-1	Proteína inhibidora del activador del plasminógeno-1
PKA	Proteína quinasa A
PLB	Fosfolamban
PTH	Hormona paratiroidea
RXR	Receptor retinoide X
SERCA	Bomba ATPasa de Ca <sup>2+</sup> 2a del retículo sarcoplasmático

SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TLR4	Receptores de tipo Toll 4 ( <i>Toll like receptor 4</i> )
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	Elementos de respuesta a VDR
WT	<i>Wild type</i>

## 1. Introducción

La vitamina D es conocida como una vitamina liposoluble, pero en realidad se trata de una prohormona que se obtiene mayoritariamente en el organismo por síntesis endógena gracias a la acción del sol. Su función principal es la de regular los niveles séricos de Ca<sup>2+</sup> y fósforo, por ello su deficiencia se ha asociado tradicionalmente al raquitismo en los niños y a la osteomalacia en los adultos. La vitamina D se encuentra en la naturaleza en dos formas: el ergocalciferol de origen vegetal o vitamina D2 y el colecalciferol o vitamina D3, de origen animal. La principal fuente de esta vitamina y por la que obtenemos más del 80% de los requerimientos diarios de nuestro organismo, se produce al incidir los rayos UV del sol (280-310 nm) sobre el 7-dehidrocolesterol presente en la epidermis transformándolo en previtamina D3 que, por isomerización espontánea, dará lugar a la vitamina D3 o colecalciferol. Esta molécula es biológicamente inactiva y deberá sufrir hidroxilaciones sucesivas para finalmente dar lugar a la molécula biológicamente más activa o calcitriol (1 $\alpha$ ,25-dihidroxitriol; ver Figura 1). La otra fuente de vitamina D proviene

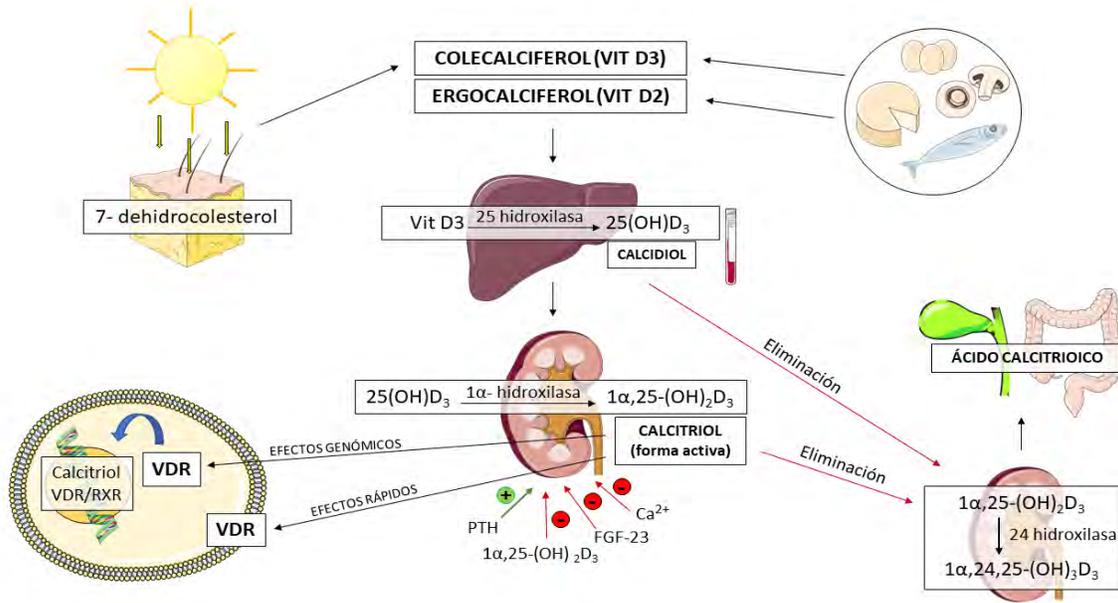


Figura 1. Metabolismo de la vitamina D.

de la dieta o los suplementos y en ambos casos también requerirán de sucesivas hidroxilaciones en el organismo para obtener finalmente la vitamina D3 activa o calcitriol. La primera hidroxilación tiene lugar en el hígado por acción de la 25-hidroxilasa y el producto resultante es la 25-hidroxivitamina D3 o calcidiol, principal metabolito circulante utilizado para medir los niveles de la vitamina D ya que se encuentra en el rango nano molar y su vida media es larga, de aproximadamente tres semanas, mientras que el calcitriol se encuentra en el rango pico molar y su vida media es mucho más corta, unos 3-5 días. Los niveles séricos de calcidiol se miden en nmol/L o ng/mL, siendo la equivalencia de 1 nmol/L igual a 0.4 ng/mL [1]. Se estima que niveles séricos de calcidiol por encima de 30 ng/mL son suficientes para mantener un estado de salud adecuado. Se considera insuficiencia niveles entre 20-30 ng/mL y deficiencia niveles por debajo de 20 ng/mL [2]. Posteriormente este calcidiol se transporta en sangre hasta el riñón principalmente, donde sufre una segunda hidroxilación por acción de la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP27B1) que lo convertirá en la forma activa de la vitamina D o calcitriol (1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D3). Esta segunda hidroxilación, además, se puede llevar a cabo en tejidos extrarrenales o células que poseen la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa [1] (Figura 1).

Para la inactivación y eliminación de los productos del metabolismo de vitamina D, tanto el calcitriol como el calcidiol sufren una nueva hidroxilación que tiene lugar principalmente en las células del riñón por la 24-hidroxilasa (CYP24A1). A continuación, el 1 $\alpha$ ,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub> y el 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> son oxidados y convertidos en ácido calcitriólico que se eliminará prácticamente en su totalidad por vía biliar-fecal [1] (Figura 1).

La vía metabólica de la vitamina D, descrita anteriormente, está regulada por un mecanismo biológico que depende principalmente de los niveles de Ca<sup>2+</sup> fósforo o calcitriol en sangre, y de su efecto sobre las enzimas 1 $\alpha$ -hidroxilasa y 24-hidroxilasa.

De esta manera, unos niveles bajos de Ca<sup>2+</sup> o calcitriol en sangre estimulan la síntesis de la hormona paratiroidea (PTH), que a su vez actúa sobre el riñón estimulando la reabsorción de Ca<sup>2+</sup> en el túbulo distal y aumentando la producción de 1 $\alpha$ -hidroxilasa que promueve la síntesis de calcitriol. Además, la PTH inhibe la actividad de la enzima 24-hidroxilasa, lo que inhibe la inactivación y eliminación de calcitriol por vía biliar-fecal. Asimismo, la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa tiene un mecanismo de autorregulación por el que niveles altos de esta enzima inhiben su propia actividad [1, 3]. Por otro lado, el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF-23) también tiene un papel muy importante en la regulación de la actividad biológica de la vitamina D. Cuando existen niveles altos de calcitriol en sangre, FGF-23 actúa sobre CYP24A1, estimulando la eliminación de calcidiol y calcitriol, y sobre CYP27B1, inhibiendo la síntesis de calcitriol [4, 5] (Figura 1).

El calcitriol ejerce sus efectos actuando como un ligando para el receptor de vitamina D (VDR). VDR es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción activados por ligando y se clasifica dentro de la subfamilia de receptores nucleares 1, grupo I, miembro 1. La unión de la forma activa de la vitamina D, calcitriol, a VDR favorece la unión con el Receptor retinoide X (RXR). Este heterodímero es capaz de reclutar complejos coactivadores o correpresores para unirse a los elementos de respuesta de la vitamina D (VDRE) en el ADN, y de esta forma, activar o inhibir la expresión de numerosos genes. Se ha estimado que la activación de VDR por calcitriol regula cerca de un 3% del genoma humano [6], lo cual es congruente con funciones hormonales ampliamente distribuidas por todo el organismo y no solo relacionadas con el metabolismo óseo. Además de sus clásicos efectos genómicos, existe evidencia de que el calcitriol puede inducir también efectos rápidos no genómicos mediados por el VDR asociado a membrana que implican la estimulación de canales iónicos, principalmente Ca<sup>2+</sup>, y

la activación de segundos mensajeros [7]. Por otro lado, VDR, así como la maquinaria enzimática requerida para su activación y función, han sido identificados en el sistema nervioso central, el sistema inmune, el tejido adiposo y el sistema cardiovascular, entre otros [1, 8]. Numerosos estudios han demostrado que la activación de este receptor se asocia a procesos muy diversos entre los que podemos destacar proliferación y diferenciación celular, inmunidad, apoptosis, estrés oxidativo, transporte de membrana, homeostasis de la matriz extracelular o adhesión celular [8-10]. Por lo tanto, actualmente se acepta que la vitamina D juega un papel relevante en la fisiología humana que va más allá de sus acciones sobre el metabolismo óseo. En este sentido, ya hace más de treinta años que se viene observando la existencia de una deficiencia o insuficiencia de vitamina D en la población mundial, incluso en regiones con buena exposición solar [11, 12]. Estudios epidemiológicos y clínicos han sugerido que esta deficiencia o insuficiencia de vitamina D podría contribuir al desarrollo o a un peor pronóstico de algunas de las enfermedades más prevalentes en el mundo como son las enfermedades cardiovasculares, el cáncer o las enfermedades autoinmunes [1, 13].

## 2. Insuficiencia cardíaca

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial; la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que al año mueren en el mundo unos 17.9 millones de personas a causa de estas patologías [14]. Sabemos que, dentro de las enfermedades cardiovasculares, la insuficiencia cardíaca (IC) supone la tercera causa de muerte de origen cardiovascular. La IC va a aparecer como un síndrome final común de varias patologías muy frecuentemente asociadas con el envejecimiento como son la cardiopatía isquémica, la cardiopatía hipertensiva, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o la diabetes.

Precisamente porque en los últimos años ha mejorado mucho la supervivencia de pacientes con estas comorbilidades, los casos de IC casi se duplicaron desde 1990 hasta 2017, pasando de 33.5 millones en 1990 a 64.3 millones en 2017 [15].

La IC supone un gran gasto para los sistemas nacionales de salud ya que es la primera causa de hospitalización en los mayores de 65 años. Por otro lado, y a pesar de algunos avances que se han producido en la terapéutica en los últimos años [16], la IC sigue siendo una enfermedad con una baja supervivencia. Después del primer diagnóstico ésta se estima en un 50% a los cinco años y muchos de estos fallecimientos se producen de forma súbita e inesperada, presumiblemente como consecuencia de arritmias ventriculares letales. Por lo tanto, y a pesar de los últimos avances en la terapéutica, la IC sigue representando un desafío clínico muy importante por su alta prevalencia, morbilidad y mortalidad. Mejorar el pronóstico de estos pacientes es fundamental, y para ello es necesario una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la génesis y progresión de la IC para, de esta forma, identificar nuevas dianas terapéuticas que nos ayuden a obtener nuevos fármacos seguros y eficaces que puedan administrarse con los restantes tratamientos que recibe el paciente [17]. En este sentido, el receptor de vitamina D aparece como una interesante propuesta.

Para conocer mejor los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la génesis y progresión de la IC hay que recordar que aproximadamente el 70% de los casos de IC tienen su origen en la cardiopatía isquémica y en la hipertensión arterial crónica.

De forma esquemática y sencilla podemos indicar que como consecuencia de un infarto de miocardio o de una hipertensión arterial crónica, el corazón aumenta de tamaño en lo que se conoce como hipertrofia compensada, normalizando el estrés de la pared ventricular y optimizando la función de bomba. Pero si esta situación se mantiene en el tiempo se inicia un proceso conocido como remodelado deletéreo o patológico [18-20] que, finalmente, conducirá a una dilatación de la cámara ventricular y a una disfunción cardíaca. Durante este remodelado se va a producir una activación del sistema nervioso adrenérgico y del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que van a favorecer la progresión de la enfermedad. Otra de las características asociadas a este remodelado patológico es el aumento de fibrosis tanto a nivel intersticial como perivascular. Como consecuencia, disminuirá el acoplamiento eléctrico y la velocidad de conducción del impulso eléctrico en distintas zonas del miocardio, lo que favorecerá la dispersión del periodo refractario y en definitiva ayudará a la aparición de un tipo de arritmias conocidas como arritmias por reentrada. Durante este proceso de fibrosis, los fibroblastos se transforman en miofibroblastos, los cuales poseen una mayor capacidad de migración y proliferación y un perfil claramente proinflamatorio. Estos miofibroblastos van a favorecer la liberación de citoquinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleuquina (IL), 1 beta (IL-1 $\beta$ ) o IL-6 y también favorecerán la liberación de factores de crecimiento profibróticos como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que, junto con las citoquinas proinflamatorias, van a estimular la expresión de la proteína inhibitoria del activador de plasminógeno (PAI-1), cuya función principal es potenciar la producción de fibrosis a través de la inactivación de metaloproteinasas que son las que se encargan de degradar la matriz extracelular. Por lo que respecta a los cardiomiocitos, durante este remodelado patológico, va a disminuir su número debido a un aumento de la apoptosis sobre todo tras un infarto de miocardio, pero los cardiomiocitos que quedan aumentan su volumen individual. Por otro lado, se van a producir dos procesos de gran interés: un remodelado iónico arritmogénico y una desregulación de ciertas proteínas implicadas en el manejo de calcio intracelular en el corazón. En el primer caso, este remodelado arritmogénico se relaciona con una disminución en la expresión y/o función de ciertos canales de K<sup>+</sup> voltaje-dependientes, lo que ocasionará un enlentecimiento en la repolarización cardíaca y un aumento del intervalo QT del ECG, favoreciendo la aparición de arritmias ventriculares graves [21].

En el segundo caso, las alteraciones en el dinamismo del Ca<sup>2+</sup> se relacionan con una disminución en la expresión y/o actividad de la bomba ATPasa de Ca<sup>2+</sup> 2a del retículo sarcoplasmático (SERCA), una mayor expresión y/o actividad del intercambiador Na<sup>+</sup> / Ca<sup>2+</sup> y una liberación anormal de Ca<sup>2+</sup> desde los canales de rianodina, durante la diástole. Estas alteraciones van a facilitar no solo la disfunción contráctil sino también la aparición de pospotenciales tardíos y/o precoces capaces de generar arritmias por actividad desencadenada [22].

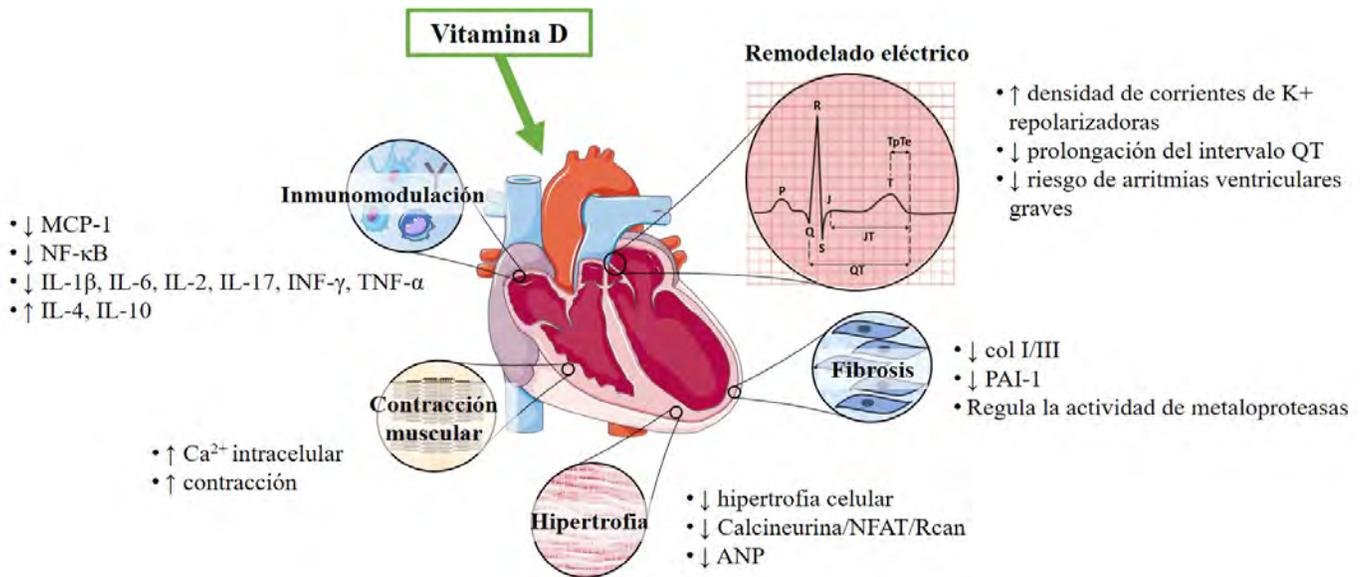


Figura 2. Mecanismos implicados en el efecto cardioprotector de la vitamina D sobre el remodelado eléctrico, la fibrosis, la hipertrofia cardíaca, la contracción cardíaca y la activación del sistema inmune.

### 3. Mecanismos cardioprotectores de la vitamina D

#### 3.1. Sistema renina-angiotensina-aldosterona

El SRAA es la vía más importante para regular la presión arterial, el volumen extracelular y el equilibrio osmótico en el organismo. Tanto el daño cardíaco como la sobrecarga, ya sea por volumen o presión, activan de forma crónica el SRAA, contribuyendo a la aparición de un remodelado cardíaco adverso y al deterioro de la función ventricular, de forma que un mayor grado de activación de este sistema se asocia con un peor pronóstico de la IC [23]. En la bibliografía científica, uno de los mecanismos cardioprotectores más estudiados de la vitamina D es la regulación de la activación del SRAA, ya que existen estudios observacionales que han mostrado una relación entre la deficiencia de vitamina D y una mayor activación del SRAA, mientras que su suplementación disminuye la actividad y la concentración de renina plasmática en pacientes [24], que es la enzima secretada por el riñón y activadora de este sistema. El aumento de la expresión génica de renina activa a su vez vías intracelulares secundarias que afectan directamente a las células del sistema circulatorio [25].

A nivel experimental, está descrito que los ratones carentes de VDR presentan hipertensión y niveles elevados de la expresión de renina y angiotensina II y que el tratamiento de ratones *wild type* (WT) con calcitriol reduce los niveles de expresión de renina hasta un 50% [26]. Hay varios mecanismos de acción descritos que podrían estar implicados en este efecto. Por un lado, se ha demostrado que la activación de VDR por calcitriol participa en la regulación transcripcional del gen de renina a través de los elementos de respuesta al monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) [26]. Por otro lado, experimentos *in vitro* han mostrado que el calcitriol reduce la metilación del silenciador del gen de la renina, lo que se traduce en una disminución de su expresión [27] (Figura 2).

#### 3.2. Hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca patológica implica un aumento del tamaño del corazón como respuesta a una sobrecarga hemodinámica o funcional desencadenada por estímulos deletéreos, lo que supone la reexpresión de genes fetales, alteraciones en el estado metabólico y energético cardíaco y cambios tanto a nivel celular como molecular que finalmente se traducen en un remodelado ventricular con disfunción cardíaca [18].

Con relación a la vitamina D, hace más de veinte años que se demostraron sus efectos antihipertróficos en cardiomiocitos neonatales de rata, en los que se observó una reducción en los marcadores de hipertrofia asociados a la IC al tratar las células con calcitriol [28]. Actualmente, gracias a los experimentos de inmunofluorescencia de Chen *et al.*, [29] sabemos que tanto el VDR como la enzima 1α-hidroxilasa están presentes en cardiomiocitos y que su eliminación induce hipertrofia y disfunción cardíaca.

La actividad antihipertrófica de la vitamina D también se ha demostrado en estudios experimentales *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas [30], en ratas sensibles a la sal (Dahl S) [31], en modelos de hipertrofia cardíaca en el ratón [32, 33] y en otros modelos animales como en cerdos hipercolesterolémicos tratados con una dieta deficitaria en vitamina D [34]. En cuanto a los mecanismos moleculares implicados, sabemos que la activación de VDR ejerce sus efectos antihipertróficos a través de la supresión de la activación de la vía calcineurina/factor nuclear de las células T activadas (NFAT), una de las vías pro-hipertróficas implicadas en la IC [33]. Así mismo, es importante destacar que el tratamiento con un análogo del calcitriol ha demostrado ser capaz de reducir la expresión génica del biomarcador de hipertrofia, péptido natriurético auricular (ANP), en modelos experimentales de hipertrofia e IC [33, 35, 36] (Figura 2).

### 3.3. Fibrosis cardíaca

La fibrosis cardíaca es un proceso de remodelado patológico de la matriz extracelular (MEC), que conduce a anomalías en su composición y que está asociado a enfermedades como la IC. El daño cardíaco, a través de numerosos mecanismos, estimula la replicación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos, lo que implica una excesiva y continua expresión génica y la deposición de colágeno tipo I y III, promoviendo la fibrogénesis [37]. Este aumento de los niveles de colágeno y la alteración de la proporción de colágeno tipo I/III favorecen la disfunción tisular, que se asocia a un deterioro de la contracción y relajación cardíaca, una mayor rigidez en el ventrículo izquierdo y una disfunción diastólica en la IC. Además, la fibrosis dificulta la conducción del impulso eléctrico cardíaco, aumentando el riesgo de arritmias, tanto a nivel auricular como ventricular [38]. Por lo tanto, prevenir y reducir la formación de fibrosis en el tejido cardíaco disminuye el riesgo de disfunción y mejora el pronóstico de pacientes con IC.

Sabemos que la vitamina D participa en la regulación de la composición de la MEC mediante la modulación de la expresión génica de las metaloproteinasas a través de la activación de VDR, contribuyendo así a la degradación, la síntesis y el remodelado de la misma durante el desarrollo de la IC [39]. Más concretamente, se ha demostrado que el tratamiento con un activador del VDR en ratones con IC disminuye la expresión génica de PAI-1 [33]. Por otro lado, también se ha observado que ratones con una dieta deficiente en vitamina D cuentan con mayor depósito de colágeno en la MEC [40] y que, el tratamiento con esta vitamina o activadores del receptor disminuye el porcentaje de fibrosis intersticial y perivascular a través de la reducción en la expresión del ARN mensajero (ARNm) del colágeno tipo I y tipo III en algunos modelos experimentales de IC [32, 33, 35, 36] (Figura 2).

### 3.4. Remodelado eléctrico

La actividad eléctrica cardíaca comienza por la generación de potenciales de acción (PA) automáticos en las células marcapasos del nodo del seno. El PA se define como los cambios reversibles del potencial de membrana de las células cardíacas producidos como consecuencia del flujo de iones a través de la membrana. La propagación de estos PA crea una onda de excitación a través de la aurícula que conduce a su despolarización, y que se corresponde con la onda P del electrocardiograma (ECG) (Figura 2). A continuación, la onda de excitación pasa a través del nodo auriculoventricular hacia los ventrículos dando lugar a la despolarización ventricular que se corresponde con el complejo QRS del ECG y por último tiene lugar la repolarización ventricular que se relaciona con el intervalo QT del ECG. En los pacientes con IC es común apreciar una prolongación del intervalo QT (Figura 2), lo que les predispone a sufrir arritmias graves, aumentando el riesgo de muerte súbita [21].

Las corrientes iónicas implicadas en la duración del intervalo QT y, por tanto, en la repolarización del PA de los cardiomiocitos ventriculares, son fundamentalmente las corrientes de salida  $K^+$ , que se encuentran disminuidas en la IC [21].

Existe evidencia clínica de que una deficiencia de vitamina D se asocia con una mayor incidencia de muerte cardíaca súbita [41] y se ha comprobado que el tratamiento con calcitriol provoca una reducción del intervalo QT en pacientes en hemodiálisis con hiperparatiroidismo secundario [42]. Existen pocos estudios experimentales que expliquen el posible mecanismo implicado, sin embargo, se ha demostrado *in vitro* que el calcitriol es capaz de modular directamente las principales corrientes de  $K^+$  implicadas en la repolarización del PA en cardiomiocitos de ratón [43]. Además, el tratamiento con un activador de vitamina D en ratones con IC, aumenta la densidad de estas mismas corrientes traduciéndose en una disminución de la prolongación del intervalo QT, reduciendo el riesgo de aparición de arritmias ventriculares graves [33]. Todo esto, sumado al anteriormente descrito efecto antifibrótico, que facilita la conducción del impulso eléctrico cardíaco, serían mecanismos a través de los cuales la vitamina D disminuiría la predisposición a padecer determinados tipos de arritmias ventriculares con frecuencia asociadas a la IC crónica.

### 3.5. Acoplamiento excitación-contracción

El impulso eléctrico generado en la región automática del corazón llega a los cardiomiocitos, donde estimula la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L (LTCC) induciendo el mecanismo de excitación-contracción cardíaco (ECC) y favoreciendo la activación de la maquinaria contráctil del cardiomiocito [22].

Como se ha comentado previamente en la patogénesis de la IC se produce una alteración de los mecanismos reguladores del  $Ca^{2+}$  intracelular, comprometiendo la contracción celular, lo que puede ocasionar disfunción cardíaca y favorecer la aparición de arritmias [22].

Estudios *in vitro* han demostrado que el calcitriol es capaz de aumentar las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo L en cardiomiocitos adultos a través de la activación de la proteína quinasa A (PKA), lo que se ha relacionado con una mayor contracción celular [7, 44-46]. En modelos experimentales de IC, la activación de VDR ha mostrado una mejora a nivel del manejo de  $Ca^{2+}$  intracelular, a través de la modulación de la expresión génica de SERCA, y de su modulador el fosfolamban (PLB), por otro lado, también se ha descrito un efecto inhibitorio sobre el aumento de las liberaciones espontáneas de  $Ca^{2+}$  durante la diástole. Todos estos mecanismos se traducen finalmente en una mejora de la función cardíaca y una menor susceptibilidad para la aparición de arritmias por actividad desencadenada [33, 47] (Figura 2).

### 3.6. Inmunidad e inflamación

Está ampliamente reconocido que la activación de las células inmunes y el aumento de factores proinflamatorios juegan un papel fundamental en el desarrollo de la IC. Por otra parte, sabemos que tanto las células dendríticas como los macrófagos y los linfocitos T y B expresan el VDR en forma constitutiva o después de su estimulación, lo que sugiere un papel importante de la vitamina D en su funcionamiento [48]. Estudios observacionales en hu-

manos han relacionado el déficit de vitamina D con una concentración elevada de marcadores sistémicos de inflamación [49, 50]. Por otra parte, niveles adecuados de vitamina D en suero se han asociado con niveles elevados de citoquinas antiinflamatorias incluyendo la IL-4 y la IL-10, y con niveles más bajos de citoquinas proinflamatorias, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2, IL-17, interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) y TNF- $\alpha$  [51-53]. En estudios experimentales, se ha observado que tratamientos con distintos agonistas de la vía de la vitamina D inducen, en presencia de un daño cardíaco, una menor infiltración de macrófagos en el tejido, una reducción de marcadores inflamatorios y una disminución en la expresión del *Toll like receptor 4* (TLR4) [35, 54, 55]. En este sentido, Krishnan *et al.*, [56] describieron que el mecanismo implicado en el papel antiinflamatorio de la vitamina D incluía la supresión de la expresión génica de los receptores de proteína quimiotáctica de macrófagos-1 (MCP-1) y de prostaglandinas, y la regulación al alza de la expresión de la deshidrogenasa 15-hidroxiprostaglandina (15-PGDH). Además, se ha demostrado que la actividad del factor nuclear *kappa* de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), factor transcripcional clave que regula la expresión de citoquinas inflamatorias en el corazón después de un estímulo patológico [57], es inhibida por el calcitriol y su análogo paricalcitol, atenuando el desarrollo de complicaciones cardiovasculares e induciendo efectos cardioprotectores [58] (Figura 2).

#### 4. Ensayos clínicos

En las últimas décadas, un gran número de estudios observacionales han evidenciado la existencia de una clara deficiencia de vitamina D entre los pacientes con IC [59]. Más aún, se ha demostrado que esta deficiencia se correlaciona con un peor pronóstico y una mayor mortalidad [60]. Por lo tanto, el objetivo de numerosos ensayos clínicos en los últimos años ha sido analizar el posible efecto beneficioso del tratamiento con suplementos de vitamina D en pacientes con IC [61]. Desafortunadamente, los ensayos clínicos publicados hasta la fecha no son concluyentes ya que, aunque algunos han mostrado claramente efectos beneficiosos, otros no han observado diferencias. Por ejemplo, en el estudio VINDICATE (Estudio *VitamIN D treating patients with Chronic heArT failure*) [62], 229 pacientes con una edad media de 69 años con IC diagnosticada y valores de vitamina D por debajo de 20 ng/mL se trataron con 4000 UI diarias de colecalciferol durante un año. Al finalizar el estudio, aunque no se encontraron diferencias en el objetivo primario (prueba de marcha de seis minutos), sí que se observó una mejora significativa en la fracción de eyección y una reversión en el remodelado adverso del ventrículo izquierdo, en el grupo tratado con vitamina D. Por el contrario, en el estudio EVITA (*Effect of vitamin D on all-cause mortality in heart failure*) [63] realizado sobre 400 pacientes diagnosticados de IC y tratados con 4000 UI diarias de colecalciferol durante tres años no se observó ninguna diferencia en la mortalidad entre el grupo con tratamiento y el grupo placebo, aunque un análisis *post-hoc* del mismo estudio, en el que se analizaron por separado los resultados de pacientes mayores de cincuenta años, sí mostró que el tratamiento con cole-

calciferol mejoraba significativamente la función del ventrículo izquierdo [64].

En general, la comparación entre estudios es complicada debido a la variabilidad en las dosis usadas, el tipo de suplemento, la duración de los tratamientos, los niveles basales de vitamina D en los distintos grupos (deficiencia, insuficiencia o suficiencia de vitamina D) y la gravedad de la IC al inicio del tratamiento. Además, un estudio reciente publicado en la revista *Lancet* mostró que los efectos beneficiosos de los suplementos de vitamina D se observaban fundamentalmente entre aquellos pacientes con niveles de vitamina D inferiores a 20 ng/mL [65].

#### 5. Conclusiones

La vitamina D es un micronutriente necesario para el correcto funcionamiento de nuestro organismo. En los últimos años, se han publicado numerosos estudios observacionales que han mostrado una elevada prevalencia de déficit de vitamina D en pacientes con IC, asociándose este hallazgo con un peor pronóstico. El abordaje terapéutico con suplementos de vitamina D podría ser potencialmente beneficioso dado que los estudios experimentales han demostrado numerosos mecanismos por los cuales la vitamina D y la activación de su receptor podrían tener un papel protector en la IC. Sin embargo, en estos momentos no existe un consenso sobre la suplementación de vitamina D en pacientes con IC, más allá de restaurar los niveles séricos hasta alcanzar valores en el rango óptimo fisiológico (30 ng/mL). Para llegar a una conclusión clara sobre los efectos beneficiosos de la suplementación con vitamina D en pacientes con IC, serían necesarios futuros ensayos clínicos prospectivos con un número elevado de pacientes, seleccionados en función de sus niveles de vitamina D de partida y sometidos a tratamientos de larga duración con dosis óptimas y regímenes apropiados de vitamina D.

#### Referencias

- [1] Bikle, D. D., Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol.* 2014; 21(3):319-29.
- [2] Wacker, M., Holick, M. F., Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol.* 2013; 5(1):51-108.
- [3] Ritter, C. S., Brown, A. J., Direct suppression of Pth gene expression by the vitamin D prohormones doxercalciferol and calcidiol requires the vitamin D receptor. *J Mol Endocrinol.* 2011; 46(2):63-6.
- [4] Navarro-García, J. A., Fernández-Velasco, M., Delgado, C., Delgado, J. F., Kuro-O, M., Ruilope, L. M., *et al.* PTH, vitamin D, and the FGF-23-klotho axis and heart: Going beyond the confines of nephrology. *Eur J Clin Invest.* 2018; 48(4).
- [5] Hu, M. C., Shiizaki, K., Kuro-o, M., Moe, O. W., Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2013; 75:503-33.
- [6] Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., Van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., *et al.* Vitamin D and human health:

- lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008; 29(6):726-76.
- [7] Tamayo, M., Manzanares, E., Bas, M., Martín-Nunes, L., Val-Blasco, A., Larriba, M. J., *et al.* Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) increases L-type calcium current via protein kinase A signaling and modulates calcium cycling and contractility in isolated mouse ventricular myocytes. *Heart Rhythm.* 2017; 14(3):432-9.
- [8] Norman, P. E., Powell, J. T., Vitamin D and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2014; 114(2):379-93.
- [9] Nagpal, S., Na, S., Rathnachalam, R., Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005; 26(5):662-87.
- [10] Wang, Y., Zhu, J., DeLuca, H. F., Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys.* 2012; 523(1):123-33.
- [11] Holick, M. F., Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007; 357(3):266-81.
- [12] Cashman, K. D., Dowling, K. G., Škrabáková, Z., Gonzalez-Gross, M., Valtueña, J., De Henauw, S., *et al.* Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr.* 2016; 103(4):1033-44.
- [13] Rosen, C. J., Adams, J. S., Bikle, D. D., Black, D. M., Demay, M. B., Manson, J. E., *et al.* The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2012; 33(3):456-92.
- [14] Organización Mundial de la Salud (OMS). Las 10 principales causas de defunción. [Internet] [Consultado febrero 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- [15] Heart Failure. World Heart Federation. [Internet] [Consulta febrero 2022]. Disponible en: <https://world-heart-federation.org/what-we-do/heart-failure/>
- [16] Tamargo, J., López-Sendón, J., Novel therapeutic targets for the treatment of heart failure. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(7):536-55.
- [17] Tamargo, J., Nuevos fármacos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (aventuras, desastres y alegrías). *An RANM.* 2021; 138(01): 44-51
- [18] Mailliet, M., van Berlo, J. H., Molkentin, J. D., Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14(1):38-48.
- [19] Heusch, G., Libby, P., Gersh, B., Yellon, D., Böhm, M., Lopaschuk, G., *et al.* Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet.* 2014; 383(9932):1933-43.
- [20] Minicucci, M. F., Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Paiva, S. A., Zornoff, L. A., Heart failure after myocardial infarction: clinical implications and treatment. *Clin Cardiol.* 2011; 34(7):410-4.
- [21] Nass, R. D., Aiba, T., Tomaselli, G. F., Akar, F. G., Mechanisms of disease: ion channel remodeling in the failing ventricle. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008; 5(4):196-207.
- [22] Bers, D. M., Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002; 415(6868):198-205.
- [23] Patel, S., Rauf, A., Khan, H., Abu-Izneid, T., Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother.* 2017; 94:317-25.
- [24] Schrotten, N. F., Rulfrok, W. P., Kleijn, L., Dokter, M. M., Silljé, H. H., Lambers Heerspink, H. J., *et al.* Short-term vitamin D<sub>3</sub> supplementation lowers plasma renin activity in patients with stable chronic heart failure: an open-label, blinded end point, randomized prospective trial (VitD-CHF trial). *Am Heart J.* 2013; 166(2):357-64.e2.
- [25] Sullivan, R. D., Mehta, R. M., Tripathi, R., Reed, G. L., Gladysheva, I. P., Renin activity in heart failure with reduced systolic function-new insights. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(13).
- [26] Li, Y. C., Kong, J., Wei, M., Chen, Z. F., Liu, S. Q., Cao, L. P., 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002; 110(2):229-38.
- [27] Govender, D., Damjanovic, L., Gaza, C. A., Meyer, V., Vitamin D decreases silencer methylation to downregulate renin gene expression. *Gene.* 2021; 786:145623.
- [28] Wu, J., Garami, M., Cheng, T., Gardner, D. G., 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1996; 97(7):1577-88.
- [29] Chen, S., Law, C. S., Grigsby, C. L., Olsen, K., Hong, T. T., Zhang, Y., *et al.* Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy. *Circulation.* 2011; 124(17):1838-47.
- [30] Kong, J., Kim, G. H., Wei, M., Sun, T., Li, G., Liu, S. Q., *et al.* Therapeutic effects of vitamin D analogs on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Am J Pathol.* 2010; 177(2):622-31.
- [31] Choi, J. H., Ke, Q., Bae, S., Lee, J. Y., Kim, Y. J., Kim, U. K., *et al.* Doxercalciferol, a pro-hormone of vitamin D, prevents the development of cardiac hypertrophy in rats. *J Card Fail.* 2011; 17(12):1051-8.
- [32] Chen, S., Gardner, D. G., Liganded vitamin D receptor displays anti-hypertrophic activity in the murine heart. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013; 136:150-5.
- [33] Tamayo, M., Martín-Nunes, L., Val-Blasco, A., G M-Piedras MJ, Navarro-García JA, Lage E, *et al.* Beneficial effects of paricalcitol on cardiac dysfunction and remodelling in a model of established heart failure. *Br J Pharmacol.* 2020; 177(14):3273-90.
- [34] Gupta, G. K., Agrawal, T., DelCore, M. G., Mohiuddin, S. M., Agrawal, D. K., Vitamin D deficiency induces cardiac hypertrophy and inflammation in epicardial adipose tissue in hypercholesterolemic swine. *Exp Mol Pathol.* 2012; 93(1):82-90.
- [35] Zhang, L., Yan, X., Zhang, Y. L., Bai, J., Hidru, T. H., Wang, Q. S., *et al.* Vitamin D attenuates pressure overload-induced cardiac remodeling and dysfunction in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018; 178:293-302.
- [36] Meems, L. M., Cannon, M. V., Mahmud, H., Voors, A. A., van Gilst WH, Silljé HH, *et al.* The vitamin D receptor activator paricalcitol prevents fibrosis and diastolic dysfunction in a murine model of pressure overload. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012; 132(3-5):282-9.
- [37] Hinderer, S., Schenke-Layland, K., Cardiac fibrosis - A short review of causes and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019; 146:77-82.
- [38] Fan, D., Takawale, A., Lee, J., Kassiri, Z., Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012; 5(1):15.
- [39] Rahman, A., Hershey, S., Ahmed, S., Nibbelink, K., Simpson, R. U., Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 103(3-5):416-9.

- [40] Weishaar, R. E., Kim, S. N., Saunders, D. E., Simpson, R. U., Involvement of vitamin D3 with cardiovascular function. III. Effects on physical and morphological properties. *Am J Physiol.* 1990; 258(1 Pt 1):E134-42.
- [41] Pilz, S., März, W., Wellnitz, B., Seelhorst, U., Fahrleitner-Pammer, A., Dimai, H. P., *et al.* Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(10):3927-35.
- [42] Kim, H. W., Park, C.W., Shin, Y. S., Kim, Y. S., Shin, S. J., Choi, E. J., *et al.* Calcitriol regresses cardiac hypertrophy and QT dispersion in secondary hyperparathyroidism on hemodialysis. *Nephron Clin Pract.* 2006; 102(1):c21-9.
- [43] Tamayo, M., Martin-Nunes, L., Val-Blasco, A., Piedras, M. J., Larriba, M. J., Gómez-Hurtado, N., *et al.* Calcitriol, the Bioactive Metabolite of Vitamin D, Increases Ventricular K. *Front Physiol.* 2018; 9:1186.
- [44] Sellés, J., Bellido, T., Boland, R., Modulation of calcium uptake in cultured cardiac muscle cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Mol Cell Cardiol.* 1994; 26(12):1593-9.
- [45] Santillán, G. E., Vazquez, G., Boland, R. L., Activation of a beta-adrenergic-sensitive signal transduction pathway by the secosteroid hormone 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D3 in chick heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31(5):1095-104.
- [46] Green, J. J., Robinson, D. A., Wilson, G. E., Simpson, R. U., Westfall, M. V., Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 41(2):350-9.
- [47] Choudhury, S., Bae, S., Ke, Q., Lee, J. Y., Singh, S. S., St-Arnaud, R., *et al.* Abnormal calcium handling and exaggerated cardiac dysfunction in mice with defective vitamin D signaling. *PLoS One.* 2014; 9(9):e108382.
- [48] Bilezikian, J. P., Bikle, D., Hewison, M., Lazaretti-Castro, M., Formenti, A. M., Gupta, A., *et al.* MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Vitamin D and Covid-19. *Eur J Endocrinol.* 2020; 183(5):R133-R47.
- [49] Dobnig, H., Pilz, S., Scharnagl, H., Renner, W., Seelhorst, U., Wellnitz, B., *et al.* Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med.* 2008; 168(12):1340-9.
- [50] Bellia, A., Garcovich, C., D'Adamo, M., Lombardo, M., Tesauro, M., Donadel, G., *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects. *Intern Emerg Med.* 2013; 8(1):33-40.
- [51] Tang, J., Zhou, R., Luger, D., Zhu, W., Silver, P. B., Grajewski, R. S., *et al.* Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol.* 2009; 182(8):4624-32.
- [52] Roffe-Vazquez, D. N., Huerta-Delgado, A. S., Castillo, E. C., Villarreal-Calderón, J. R., Gonzalez-Gil, A. M., Enriquez, C., *et al.* Correlation of Vitamin D with Inflammatory Cytokines, Atherosclerotic Parameters, and Lifestyle Factors in the Setting of Heart Failure: A 12-Month Follow-Up Study. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(22):5811.
- [53] Mahon, B. D., Wittke, A., Weaver, V., Cantorna, M. T., The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem.* 2003; 89(5):922-32.
- [54] Lee, J. W., Kim, S. C., Ko, Y. S., Lee, H. Y., Cho, E., Kim, M. G., *et al.* Renoprotective effect of paricalcitol via a modulation of the TLR4-NF-κB pathway in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 444(2):121-7.
- [55] Farhangi, M. A., Nameni, G., Hajiluian, G., Mesgari-Abbasi, M., Cardiac tissue oxidative stress and inflammation after vitamin D administrations in high fat- diet induced obese rats. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017; 17(1):161.
- [56] Krishnan, A. V., Feldman, D., Molecular pathways mediating the anti-inflammatory effects of calcitriol: implications for prostate cancer chemoprevention and treatment. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17(1):R19-38.
- [57] Valen, G., Yan, Z. Q., Hansson, G. K., Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38(2):307-14.
- [58] Chen, Y., Kong, J., Sun, T., Li, G., Szeto, F. L., Liu, W., *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses inflammation-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 by blocking nuclear factor-κB activation. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 507(2):241-7.
- [59] Durazo-Arvizu, R. A., Dawson-Hughes, B., Kramer, H., Cao, G., Merkel, J., Coates, P. M., *et al.* The reverse J-Shaped association between serum total 25-Hydroxyvitamin D concentration and all-cause mortality: The impact of assay Standardization. *Am J Epidemiol.* 2017; 185(8):720-6.
- [60] Cubbon, R. M., Lowry, J. E., Drozd, M., Hall, M., Gierula, J., Paton, M. F., *et al.* Vitamin D deficiency is an independent predictor of mortality in patients with chronic heart failure. *Eur J Nutr.* 2019; 58(6):2535-43.
- [61] Busa, V., Dardeir, A., Marudhai, S., Patel, M., Valaiyaduppu Subas, S., Ghani, M. R., *et al.* Role of vitamin D supplementation in heart failure patients with vitamin D deficiency and its effects on clinical outcomes: a literature review. *Cureus.* 2020; 12(10):e10840.
- [62] Witte, K. K., Byrom, R., Gierula, J., Paton, M. F., Jamil, H. A., Lowry, J. E., *et al.* Effects of vitamin D on cardiac function in patients with chronic HF: The VINDICATE Study. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 67(22):2593-603.
- [63] Zittermann, A., Ernst, J. B., Prokop, S., Fuchs, U., Dreier, J., Kuhn, J., *et al.* Effect of vitamin D on all-cause mortality in heart failure (EVITA): a 3-year randomized clinical trial with 4000 IU vitamin D daily. *Eur Heart J.* 2017; 38(29):2279-86.
- [64] Zittermann, A., Ernst, J. B., Prokop, S., Fuchs, U., Gruszka, A., Dreier, J., *et al.* Vitamin D supplementation of 4000 IU daily and cardiac function in patients with advanced heart failure: The EVITA trial. *Int J Cardiol.* 2019; 280:117-23.
- [65] Collaboration ERFCE-CVDS. Estimating dose-response relationships for vitamin D with coronary heart disease, stroke, and all-cause mortality: observational and Mendelian randomisation analyses. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2021; 9(12):837-46.

### CARMEN DELGADO

Licenciada en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid y doctora en Farmacología por la misma universidad. Hizo su posdoctorado en Estados Unidos como becaria Fulbright en Health Science Center, en Syracuse, Nueva York (SUNY) bajo la dirección del doctor José Jalife. Ha sido investigadora visitante en Francia y en varias unidades del INSERM (U195 en Clermont Ferrand y U390 en Montpellier) y en Estados Unidos de Norteamérica en la Universidad John Hopkins de Baltimore USA en el laboratorio dirigido por el doctor Eduardo Marban.

Es científica titular en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols de Madrid, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, donde lidera un grupo de investigación interesado en la regulación molecular y celular de la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca.

Ha publicado un total de 64 artículos científicos, 81% en Q1, ha participado como investigadora principal en trece proyectos financiados por convocatorias públicas españolas y en un proyecto europeo (BioMED2, Concerted Action).





# **Nanodominios y señalización intracelular por $\text{Ca}^{2+}$**



## Señalización por calcio intracelular

Agustín Guerrero Hernández,\* Martín Leonardo Gallegos-Gómez, Ericka Martínez Martínez,

Víctor Hugo Sánchez-Vázquez y Rodrigo Contreras-Gaytán

Laboratorio de Señalización por Calcio, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

\* Autor para correspondencia

Agustín Guerrero Hernández

Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN

Av. IPN 2508. Col. San Pedro Zacatenco, Ciudad de México, 07360, México

**Resumen:** El mantenimiento de la vida depende de la actividad de los polifosfatos (por ejemplo, los ácidos nucleicos) y su estabilidad requiere del contraíón magnesio. El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), el otro ion divalente abundante en el cuerpo humano, no puede ser el contraíón de los polifosfatos porque los inactiva al formar precipitados insolubles en el agua (piedras); por esta razón, la célula continuamente invierte energía para mantener la concentración de calcio en el citoplasma ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en niveles muy bajos, del orden de submicromolar (0.1  $\mu\text{M}$  o 100 nM) ya sea por expulsar el  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular a través de proteínas presentes en la membrana plasmática o por almacenarlo en compartimentos intracelulares (retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, etc.). Al mismo tiempo, las células responden a diversos estímulos físicos o químicos con incrementos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lo que conduce a su atrapamiento por diferentes tipos de proteínas, como la calmodulina; este complejo de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina modifica la actividad de otras proteínas lo que resulta en cambios de la función celular, ejemplos serían la contracción muscular, la fecundación, la neurotransmisión, la secreción glandular, la síntesis de ATP, el estrés oxidativo y la apoptosis, por citar algunos. Estos datos sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  es el regulador maestro de la actividad celular y a continuación se revisarán los diferentes mecanismos bioquímicos involucrados en dicha regulación.

### Abreviaturas

$[\text{Ca}^{2+}]$	Concentración de calcio	CML	Célula de músculo liso
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{AG}}$	Concentración de calcio libre del aparato de Golgi	CNGC	Canales iónicos activados por nucleótidos
$[\text{Ca}^{2+}]_e$	Concentración de calcio extracelular	DAG	Diacilglicerol
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GS}}$	Concentración de calcio libre de gránulos de secreción	DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración de calcio intracelular (en citoplasma)	EGTA	Etilen glicol-bis(2-aminoetileter) -N,N,N',N'-ácido tetraacético
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$	Concentración de calcio libre del retículo endoplásmico	GAA	Glucosil transferasa $\alpha$ (1 -> 4) ácida lisosómica
$[\text{HCO}_3^-]$	Concentración de bicarbonato	GCAP	Proteína activadora de guanilil ciclasa
$[\text{Na}^+]_i$	Concentración de sodio intracelular (en citoplasma)	GMPC	Guanosín monofosfato cíclico
$\mu\text{M}$	Micromolar	GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
AC	Adenilato ciclasa	GRP78	Proteína 78 regulada por glucosa
ADN	Ácido desoxirribonucleico	$\text{IP}_3$	Inositol 1,4,5 - trifosfato
ADP	Adenosín Difosfato	$\text{IP}_3\text{R}$	Receptor de inositol 1,4,5 - trifosfato
ADPRC	Adenosín Difosfato Ribosa cíclico	IRE1	Endoribonucleasa 1 que requiere inositol
AG	Aparato de Golgi	M	Molar
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico	MCU	Uniportador de calcio mitocondrial
ARN	Ácido ribonucleico	$\text{Mg}^{2+}$	Magnesio
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	MLC	Cadena pequeña de la miosina
ATF6	Factor de transcripción activador 6	MLCK	Cinasa de la cadena pequeña de la miosina
ATP	Adenosín trifosfato	MLIV	Mucopolidosis tipo IV
ATPasa-V	ATPasa vacuolar de protones	mM	Milimolar
BAPTA	Ácido 1, 2-Bis(2-aminofenoxi) -etano-N,N,N',N'-tetraacético	MP	Membrana plasmática
BHQ	2,5-diterbutilbenzohidroquinona	mPTP	Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
BKCa	Canales de potasio activados por calcio de conductancia grande	mV	Milivolts
Cab45	Proteína de unión a calcio de 45 kDa	NAADP	Ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato
CACNA1A	Canal de calcio neuronal operado por voltaje	NCX	Intercambiador sodio - calcio
CALNUC	Nucleobindina-1	nM	Nanomolar
CaM	Calmodulina	PERK	Cinasa del retículo endoplásmico dependiente de PRK
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico	pH	Potencial de hidrógeno
CCDV	Canal de calcio dependiente del voltaje	$\text{PIP}_2$	Fosfatidilinositol 4,5 - bisfosfato
CICR	Liberación de calcio inducida por calcio	PKA	Proteína cinasa A
		PKC	Proteína cinasa C
		PLC	Fosfolipasa C
		PMCA	ATPasa de calcio de la membrana plasmática
		RE	Retículo endoplásmico
		RS	Retículo sarcoplásmico

RTKs	Receptores con actividad cinasa de tirosina
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarco-endoplásmico
SOCE	Entrada de calcio operada por depósito
SPCA	ATPasa de calcio de la vía secretora
STIM	Molécula de interacción estromal
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
TGN	Red Trans del aparato de Golgi
TPCs	Canales de dos poros
TRP	Potencial Transiente del fotoreceptor
TRPA	Potencial Transiente del fotoreceptor con repetidos de anquirinas
TRPC	Potencial Transiente del fotoreceptor canónico
TRPM	Potencial Transiente del fotoreceptor sensible a melastatina
TRPML	Potencial Transiente del fotoreceptor asociado a mucopolidosis
TRPN	Potencial Transiente del fotoreceptor asociado a la sensación mecánica de las moscas
TRPP	Potencial Transiente del fotoreceptor asociado a riñón poliúístico
TRPV	Potencial Transiente del fotoreceptor sensible a vaniloideas
t-SNARE	Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF de compartimento diana
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
v-SNARE	Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF de vesícula

## 1. Introducción

### 1.1. ¿Qué es la señalización por $\text{Ca}^{2+}$ intracelular?

Las células son capaces de identificar señales tanto químicas como físicas por medio de receptores, que son proteínas membranales o citoplásmicas y cambiar su actividad celular en respuesta a dichas señales. Estos cambios involucran fluctuaciones en la concentración de moléculas o iones del medio intracelular, que se conocen como segundos mensajeros. El primer segundo mensajero identificado fue el ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Ringer en 1883 encontró la necesidad de incluir  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución salina que bañaba el corazón de la rana para lograr su contracción de forma consistente. Posteriormente, estudios de los mecanismos bioquímicos de la señalización celular han descubierto otros segundos mensajeros como son el AMPc (Adenosín Monofosfato cíclico), el  $\text{IP}_3$  (Inositol trifosfato), el DAG (diacilglicerol), la ADPRc (ADP-ribosa cíclica), el NAADP (Dinucleótido fosfato de ácido nicotínico y adenina), el óxido nítrico, entre otros [1].

### 1.2. ¿Qué es el ion $\text{Ca}^{2+}$ y cómo se descubrió su papel de segundo mensajero?

El ion  $\text{Ca}^{2+}$  se descubrió en 1808, tiene una masa atómica de 40 y número atómico de 20. El isótopo radiactivo del Ca que se utiliza en estudios bioquímicos es el  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  con decaimiento beta. El  $\text{Ca}^{2+}$  es el quinto elemento más abundante de la corteza terrestre y las sales de carbonato y fosfato de Ca son insolubles en agua, las cuales

al depositarse en diferentes matrices orgánicas forman estructuras duras como conchas, pezuñas, dientes y huesos. El funcionamiento de los seres vivos depende en gran medida de diversos polifosfatos, como son los ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos, pirofosfato, etc. Estos tienen como contraindicación al magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) puesto que con el  $\text{Ca}^{2+}$  se formarían precipitados de estos polifosfatos y por lo tanto no llevarían a cabo su actividad biológica. Ésta es la principal razón por la cual las células invierten una cantidad importante de energía para bajar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) a 100 nM ( $1 \times 10^{-7}$  M). Esto se debe a que en el exterior de la célula la ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) puede estar en el orden de mM ( $1 \times 10^{-3}$  M). Ningún otro ion tiene un gradiente electroquímico tan alto, lo que implica un gasto sustancial de energía por parte de las células vivas para mantener dicho gradiente [2, 3].

### 1.3. ¿Cómo se mide el $\text{Ca}^{2+}$ libre intracelular?

Para medir la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se desarrollaron tetracarboxilatos fluorescentes de alta afinidad y selectividad. El prototipo es el Fura-2, un indicador de calcio formado por la unión de dos moléculas: BAPTA y estilbena. El BAPTA, es un tetracarboxilato rígido que tiene la característica de tener un pKa más ácido que el EGTA, por lo que la concentración fisiológica de protones (cerca de pH 7.0) no afecta la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al BAPTA, además esto permite que dicha unión sea rápida, puesto que no hay que desplazar protones, y por lo tanto el Fura-2 puede seguir cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el orden de milisegundos. El estilbena es la parte fluorescente del Fura-2, cuyo espectro de excitación muestra un corrimiento hacia longitudes de onda menores ante la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al BAPTA. Esta característica hace que el Fura-2 sea un indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  de cociente, puesto que la fluorescencia a 340 nm aumenta con  $\text{Ca}^{2+}$  y la fluorescencia a 380 nm disminuye con este ion. La fluorescencia a 360 nm no se modifica ante los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y por lo tanto es un control que nos permite calibrar y corroborar que los cambios en fluorescencia se deben a cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y no a algún otro artefacto como cambios en la intensidad de la luz, cambios en la concentración del indicador o la unión de algún otro metal al indicador. El BAPTA asociado con fluoresceína (Fluo-4) o con rodamina (Rhod-2) forman indicadores cuya fluorescencia aumenta con la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , y que son los indicadores utilizados con el microscopio confocal puesto que el Fura-2 requiere un láser de luz ultravioleta que no lo presentan los microscopios confocales comerciales [4].

También existen indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  derivados de proteínas, en cuyo caso la proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo general es calmodulina (CaM) y en menor grado puede ser acuorina o la troponina C. La parte fluorescente depende de la concatenación de estas proteínas unidoras de  $\text{Ca}^{2+}$  con una o dos proteínas de la familia verde fluorescente. La gran ventaja de estos indicadores proteicos es que se les pueden agregar los péptidos señal que permiten a estos indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  localizarse en regiones específicas de las células, de esta forma se puede medir los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de compartimentos intracelulares como el retículo endoplásmico (RE), la mitocondria, el aparato de Golgi (AG), el núcleo y también el citoplasma [5, 6].

## 2. Arsenal de proteínas involucradas en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$

### 2.1. Mecanismos de transporte del ion $Ca^{2+}$ en la membrana plasmática

El gradiente de  $Ca^{2+}$  entre el exterior de la célula (1 mM) y el citoplasma (100 nM) es de cuatro órdenes de magnitud (Figura 1). Esto implica que la célula invierte una fracción importante de su energía (ATP) para mantener una baja  $[Ca^{2+}]_i$ . El otro elemento para considerar el control de la  $[Ca^{2+}]_i$  es la naturaleza hidrofóbica de las membranas celulares, debido a que están formadas por bicapas de fosfolípidos y en el centro se junta las cadenas alifáticas. Por lo tanto, se requieren proteínas integrales de la membrana plasmática (MP) que establezcan vías acuosas que permitan el paso de iones a través de la MP. Hay dos mecanismos principales de transporte de  $Ca^{2+}$ , los activos y los pasivos. Los primeros consumen energía para sacar el  $Ca^{2+}$  del citoplasma en contra de su gradiente electroquímico. Los segundos son proteínas que for-

man un poro acuoso, se les conoce como canales iónicos y estos permiten la entrada de  $Ca^{2+}$  al citoplasma a favor de su gradiente electroquímico, la actividad de estos canales responde a estímulos de naturaleza muy diversa, ya sea física (como el voltaje y el calor) o química (neurotransmisores, aminas biogénicas, etc.) [1].

Los canales iónicos permeables al  $Ca^{2+}$  son proteínas integrales de membrana que presentan varios pases transmembranales y dos dominios principales, las compuertas y el filtro de selectividad. El movimiento de las compuertas determina si el canal está cerrado (no permeable) o abierto (permeable). Además, existe una segunda compuerta en aquellos canales que presentan inactivación, es decir que el canal se puede cerrar aún en presencia del estímulo que lo abrió. La ventaja de las compuertas de inactivación es que reducen la sobrecarga con  $Ca^{2+}$  de la célula y así evitan la muerte celular. Por lo general, la compuerta uno está formada por aminoácidos hidrofóbicos que bloquean el paso del  $Ca^{2+}$ ; aquellos estímulos que abren el canal propician, por mecanismos alostéricos, la rotación de los pases transmembranales donde se encuentran los aminoácidos hidrofóbicos y por lo tanto su separación, lo que

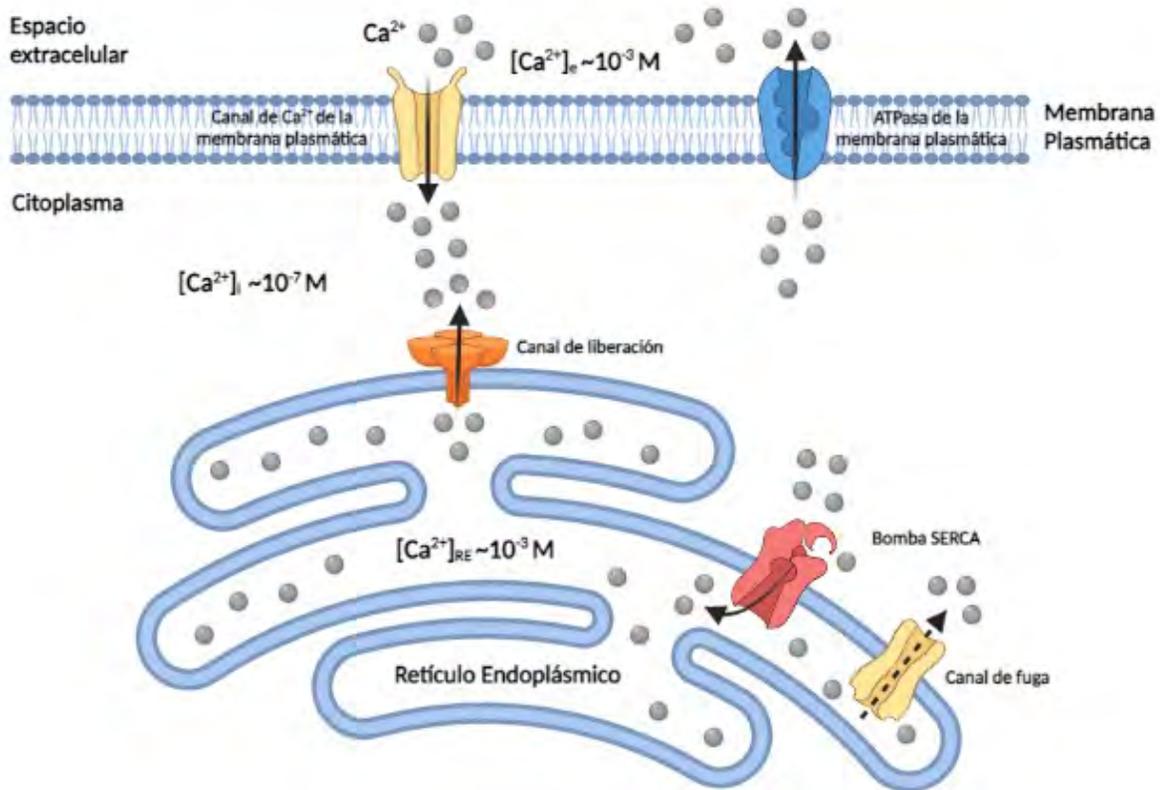


Figura 1. Las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  se mantienen constantes debido a un estado estacionario que involucra paridad de flujos de  $Ca^{2+}$  en diferentes membranas celulares. Las células vivas en reposo mantienen una concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  libre ( $[Ca^{2+}]_i$ ) del orden de 100 nM y esto se debe a un estado estacionario que gasta energía (en forma de ATP vía las diferentes bombas de Ca) de forma constante para mantener en el citoplasma dichos niveles bajos de  $Ca^{2+}$ . Esta situación de remoción constante del  $Ca^{2+}$  citoplásmico, aún en condiciones de reposo, se debe a la presencia de canales iónicos permeables al  $Ca^{2+}$  en las diferentes membranas de la célula y cuya actividad nunca es cero, ya sea porque están permanentemente abiertos (canales de fuga) o porque aún en ausencia de las señales que activan dichos canales, éstos pueden transitar al estado abierto de forma esporádica. La suma de la actividad espontánea de todos los canales de  $Ca^{2+}$  y el mismo gradiente electroquímico resulta en una entrada constante de  $Ca^{2+}$  al citoplasma que debe ser removido para mantener a la célula viva y saludable. Imagen elaborada con BioRender.com.

resulta en la apertura del canal. La segunda compuerta, por lo general, está en el extremo carboxilo terminal (C-terminal) y se desplaza al interior del poro y bloquea de forma física el paso de iones. En el caso del canal de Ca dependiente del voltaje (CCDV), CaV1.2, el mecanismo de activación de la compuerta dos ha sido estudiado ampliamente. Su desplazamiento requiere de la interacción con el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM lo cual ocurre en respuesta a un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la vecindad del canal. De esta forma, se puede concluir que el ion  $\text{Ca}^{2+}$  limita su propia entrada al citoplasma, al menos a través de los canales CaV1.2 [7, 8].

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden ser altamente selectivos o no selectivos respecto a su permeabilidad a este catión. Los canales altamente selectivos involucran un anillo de glutamatos en el filtro de selectividad. Este anillo tiene una alta afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de tal forma que sólo otro ion  $\text{Ca}^{2+}$  con suficiente energía cinética es capaz de desplazar al ion  $\text{Ca}^{2+}$  del filtro de selectividad produciendo una corriente iónica. De hecho, este proceso de interacción del ion  $\text{Ca}^{2+}$  con el filtro de selectividad explica por qué los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen corrientes iónicas unitarias muy pequeñas comparadas con otros canales como son los de potasio ( $\text{K}^+$ ) o de sodio ( $\text{Na}^+$ ). Además, se necesita un gradiente electroquímico importante para lograr el desplazamiento del ion  $\text{Ca}^{2+}$  del filtro de selectividad. En el caso de los CCDV, sólo el gradiente químico, es decir la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ , ayuda al movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  disminuye del orden de  $\mu\text{M}$ , la energía cinética del ion no es suficiente para desplazar al  $\text{Ca}^{2+}$  del filtro de selectividad, por lo que el canal se bloquea, si se continúa disminuyendo la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ , del orden de nM, entonces el CCDV se vuelve no selectivo, permitiendo el paso de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  y por lo cual se desbloquea. A este fenómeno se le conoce como fracción molar anómala, cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Na}^+$  compiten por la interacción con el filtro de selectividad de los CCDV. Esto implica que el filtro de selectividad no es una propiedad rígida de los canales, y depende de los iones que estén presentes. Los canales de alta selectividad por  $\text{Ca}^{2+}$  son los CCDV, los canales Orai, involucrados en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por el vaciamiento del RE y el canal MCU (*Mitochondrial Calcium Uniporter*, por sus siglas en inglés) [7, 9, 10]. Es interesante que estas tres familias de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta selectividad son tres diferentes soluciones por lo que su homología es muy baja.

El otro mecanismo para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma involucra la activación de canales de baja selectividad. Éstos no presentan un anillo de glutamatos y por lo mismo no discriminan entre el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$ . Tienen dos efectos principales, despolarizan a las células e incrementan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , lo segundo se debe a que la entrada de  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma tiene un impacto muy fuerte en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  debido a que normalmente está en el orden de  $100 \text{ nM}$ , mientras que la entrada de  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{Na}^+$  representa una fracción muy pequeña de la  $[\text{Na}^+]_i$  en reposo que es de  $12 \text{ mM}$ . Los canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  son canales receptores, como serían los canales nicotínicos de acetilcolina, los canales purinérgicos P2X, los canales inotrópicos al glutamato, entre otros. Una superfamilia de canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  serían los canales TRP (*Transient Receptor Potential*, por sus siglas en inglés), estos canales se descubrieron estudiando la naturaleza del canal involucrado en los cambios del potencial de membrana en respuesta a la luz del fotorreceptor del ojo de la mosca, *Drosophila melanogaster*.

Este canal de la mosca sirvió de carnada para descubrir que el humano tiene una superfamilia de canales TRP; las familias involucradas son los canales TRPC, por canónicos; TRPV, por vanilloides; TRPM por melastatina; TRPP, por poliquístico; TRPML, por mucolipina; TRPA, por anquirina y TRPN, por no mecano receptor. Los canales TRPC3, 6 y 7 son activados por el DAG de tal forma que los agonistas que inducen la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato  $\text{PIP}_2$  estimulan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales. Los canales TRPV1-4 están involucrados con la termopercepción, los canales TRPV5 y 6 son los que tienen la mayor selectividad por  $\text{Ca}^{2+}$  y su expresión responde a la vitamina D para permitir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el intestino y el riñón. El canal TRPM2 participa en la muerte celular por estrés oxidativo, el canal TRPM8 está involucrado en la criopercepción (se activa por el mentol y el icilin). Mutaciones de los canales TRPP son responsables de la enfermedad de riñón poliquístico (también se conocen como PKD). Los TRPML son los canales asociados con una de las enfermedades lisosomales conocida como mucopolisidosis. Los canales TRPA tienen un repetido de anquirina y se caracterizan por ser receptores a agonistas picantes (Wasabi, canela) por la unión covalente de estos compuestos electrofílicos con residuos de cisteína, particularmente la cisteína en la posición 621. Por último, los canales TRPN no se expresan en mamíferos, pero están involucrados con la sensación mecánica en las moscas. Este recuento demuestra que hay una gran variedad de señales tanto físicas como químicas capaces de incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  con efectos muy diferentes en la función celular [11].

El transporte activo se lleva a cabo por dos tipos de proteínas, las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX, *Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*, por sus siglas en inglés). El NCX tiene un papel preponderante en la remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  en los miocitos cardíacos. Utilizando el gradiente de  $\text{Na}^+$ , el NCX transporta tres  $\text{Na}^+$  por un  $\text{Ca}^{2+}$ , esto implica que el transporte es electrogénico, de tal forma que según el signo del potencial de membrana, el transportador puede o no funcionar en reversa, esto significa que metería  $\text{Ca}^{2+}$  ante un potencial de membrana despolarizado y por lo mismo se observan consecuencias negativas en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en los miocitos cardíacos [12].

Hay tres diferentes familias de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , todas ellas son bombas tipo P, es decir que presentan un aspártico autofosforilado como un paso crítico para producir los cambios conformacionales necesarios en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de su gradiente electroquímico. Su estructura es similar, tienen diez pases transmembranales como mínimo y es el sitio de unión de alta afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico y de baja afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. La región citoplásmica de las bombas está dividida en tres dominios el N, P y A. El dominio N une el ATP, el dominio P contiene el residuo de aspártico conservado y esencial en su actividad de bomba y el dominio A, es un sitio accionador (*actuator*, en inglés). Las tres familias de bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  son la SERCA (*Sarcoendoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase*, por sus siglas en inglés), la PMCA (*Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase*, por sus siglas en inglés) y la SPCA (*Secretory Pathway Ca<sup>2+</sup> ATPase*, por sus siglas en inglés). En esta sección solo vamos a revisar la información con respecto a PMCA y en la siguiente sección veremos la información referente a SERCA y SPCA [13].

La bomba PMCA está codificada por 4 genes (PMCA1-4). Las PMCA1 y 4 se expresan de forma ubicua; sin embargo, el *knock-out* de la PMCA1 es letal y no así el de la PMCA4 lo que sugiere que la PMCA1 es la bomba principal e irremplazable. Las PMCA2 y 3 se expresan principalmente en células excitables (células de Purkinje y granulares del cerebelo) y se caracterizan por tener una actividad basal alta en comparación a las PMCA1 y 4. Las PMCAs tienen dos sitios de *splicing* alternativo, el sitio A está en la primera asa intracelular que forman el acoplador y el sitio de unión de fosfolípidos. El otro sitio de *splicing* alternativo llamado C se encuentra dentro del sitio de unión a CaM. Las variantes de *splicing* producen más de treinta isoformas diferentes. Los fosfolípidos ácidos y los ácidos grasos insaturados activan a la bomba, además de la CaM, que es el activador principal. Interesantemente, el C-terminal de la CaM (el lóbulo con la más alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ ) es suficiente para activar a la bomba PMCA. El C-terminal de la PMCA posee un sitio de reconocimiento de dominios PDZ lo que le permite formar complejos de regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular [14].

## 2.2. Mecanismos de transporte del ion calcio de las membranas intracelulares

La mayoría de las células eucariontes tienen depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , éstos se localizan en compartimentos membranales que presentan transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  activos como las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  y pasivos como los canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ .

En el caso de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  de las membranas internas están la bomba SERCA y la bomba SPCA. La bomba SERCA transporta  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma al interior del RE o el retículo sarcoplásmico (RS) en las células musculares. Su estequiometría es de dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  transportado por un ATP hidrolizado. La autofosforilación de un residuo de aspártico transforma la bomba SERCA de alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico (conformación E1) a baja afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal (conformación E2) lo que le permite transportar el ion  $\text{Ca}^{2+}$  en contra del gradiente electroquímico. La desfosforilación de E2 permite cerrar el ciclo catalítico cuando la bomba regresa a la conformación E1. La eficiencia de este ciclo catalítico requiere una membrana como la del RE con fluidez alta (carece de colesterol y de ácidos grasos saturados). La familia de la bomba SERCA está codificada por tres genes diferentes y cada proteína tiene al menos dos isoformas por *splicing* alternativo en el C-terminal. La bomba SERCA1a es la más rápida y se expresa principalmente en las fibras musculares rápidas, la SERCA2a se expresa en corazón y su actividad está modulada por fosfolamban, un péptido que se une a la bomba y ralentiza su ciclo catalítico, la fosforilación de este péptido forma pentámeros que al disociarse de la bomba SERCA aumenta su número de forma efectiva y por lo tanto aumenta el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS del corazón. SERCA2b es la bomba más lenta y de mayor afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  y se expresa de forma generalizada, el péptido que regula la actividad de esta bomba es el “*another regulin*” y por último la SERCA3 que se expresa en células del sistema hematopoyético y el péptido que regula su actividad se conoce como “*endoregulin*”. Todos estos péptidos tienen una actividad de tipo inhibitoria y se conoce poco sus mecanismos de regulación, excepto para el

fosfolamban donde la fosforilación reduce su actividad inhibitoria. El único péptido estimulador de la bomba SERCA se conoce como DWORF pero el balance entre los péptidos inhibitorios y el activador, no está bien definido. En resumen, la bomba SERCA es el mecanismo principal de relleno de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE y su actividad está regulada por péptidos de membrana [15].

La bomba SPCA se caracteriza por transportar  $\text{Ca}^{2+}$  y también  $\text{Mn}^{2+}$ . La acumulación de  $\text{Mn}^{2+}$  en la luz del AG es esencial por su función como cofactor de enzimas como glicosiltransferasas y sulfotransferasas que producen modificaciones postraduccionales en proteínas de secreción. La ausencia de estas bombas produce una acumulación de  $\text{Mn}^{2+}$  en el citoplasma lo que resulta en diversas patologías neurológicas. Los humanos tienen dos genes ATP2C1 and ATP2C2 que codifican para dos SPCA diferentes. La SPCA1 se expresa en el AG de todas las células, particularmente en las neuronas. La expresión de SPCA2 es abundante en el AG y las vesículas de secreción de células del aparato respiratorio, gastrointestinal y genitourinario así como en las glándulas salivales y mamarias [16].

En el caso de los canales de membranas internas, tenemos dos familias principales de canales liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$ : los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) y los receptores de rianodina (RyR). Cada una de estas familias presenta tres isoformas distintas en humanos. Estos receptores/canales son tetrámeros de gran tamaño, no selectivos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  y están regulados por el mismo ion: a bajas concentraciones favorecen la liberación y a altas inhiben la actividad de dichos canales de liberación [17].

El  $\text{IP}_3\text{R}$  es una proteína tetramérica de ~10,000 aminoácidos que regula diversos procesos celulares. Su función es evidente en células no excitables, en las que genera señales de  $\text{Ca}^{2+}$  para regular el metabolismo, la secreción, fertilización, proliferación y contracción del músculo liso. En células excitables, el  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a la célula principalmente por los CCDV generando señales primarias; en estos casos los  $\text{IP}_3\text{Rs}$  tienen una función regulatoria que puede inducir cambios en la generación y función de éstas [18]. Estímulos externos como neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento estimulan la formación de  $\text{IP}_3$  por medio de la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés) o por receptores con actividad de cinasa de tirosina RTKs, los cuales están asociados a diferentes isoformas de fosfolipasa C, PLC. Al activarse las PLC hidrolizan  $\text{PIP}_2$  e incrementan las concentraciones de  $\text{IP}_3$  y de DAG [19]. El  $\text{IP}_3$  funciona uniéndose a su receptor en el RE para poder realizar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del depósito intracelular. Las isoformas de este receptor-canal consisten en tres dominios principales, tienen una estructura primaria similar, pero presentan distintas propiedades fisiológicas, las cuales son utilizadas por las células para crear señales de  $\text{Ca}^{2+}$  de un espacio y un tiempo característico para regular diversas funciones celulares. Este receptor interactúa con la membrana del RE por medio de seis dominios transmembranales, presentando un poro entre los dominios transmembranales 5 y 6. Las secciones que se extienden hacia el lumen del RE se glicosilan y el dominio de unión de  $\text{IP}_3$  está localizado cerca del amino terminal (N-terminal) en la región citosólica. Los cambios conformacionales generados por la unión de  $\text{IP}_3$  y  $\text{Ca}^{2+}$  son transmitidos a la región transmembranal para poder abrir el poro de la

proteína [18]. La liberación comienza una vez que se completa la unión de  $IP_3$  en cada una de las cuatro subunidades, induciendo cambios conformacionales que sensibilizan el sitio de unión a  $Ca^{2+}$ . Cuando el  $Ca^{2+}$  se une a la estructura, el canal se abre y el  $Ca^{2+}$  es liberado al citoplasma. La acción del ion  $Ca^{2+}$  es bimodal pues estimula e inhibe al receptor dependiendo de la  $[Ca^{2+}]_i$  [19].

El receptor de rianodina (RyR) es un receptor-canal de ~20,000 aminoácidos, es un homotetrámero que forma un cuadrado alrededor de un poro central, presenta un largo dominio citosólico donde se encuentra su extremo N-terminal y éste interactúa con proteínas reguladores generando complejos macromoleculares de señalización, mientras que el dominio C-terminal se localiza cerca del poro. Existen dos modos conocidos para la activación de los RyRs: la activación conjunta con CCDV tras la presencia de un potencial de acción o el proceso conocido como liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  (CICR, *Calcium-Induced Calcium Release*, por sus siglas en inglés), dichos mecanismos serán descritos con detalle más adelante (ver sección 5.1). El RyR presenta su isoforma 1 predominantemente en músculo esquelético y su isoforma 2 en músculo cardíaco principalmente, la isoforma 3 suele estar en conjunto con las otras en células como las neuronas, las gónadas, los vasos sanguíneos, etc. Estas isoformas presentan un 70% de homología aproximadamente [20].

El estudio constante de los receptores-canales presentes en las membranas intracelulares ha permitido aprender sobre mutaciones en las estructuras de estos, las cuales los vuelven incapaces de regular el  $Ca^{2+}$  de manera convencional y dan lugar a distintas patologías, que pueden ser tratadas tomando como blanco las vías de liberación de  $Ca^{2+}$  de estas proteínas.

### 3. Organelos intracelulares involucrados en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$

#### 3.1. Retículo endoplásmico

El RE está compuesto por un sistema continuo de membranas que forma una extensa red de cisternas que puede albergar grandes cantidades de  $Ca^{2+}$ , por lo que resulta ser el principal depósito intracelular de  $Ca^{2+}$  [21]. Adicionalmente, en el RE ocurren diversos procesos celulares que son importantes para mantener la homeostasis celular, como son la síntesis, plegamiento, modificaciones postranscripcionales y transporte de proteínas, biogénesis de lípidos de membrana, producción de colesterol y síntesis de esteroides [21, 22].

El RE está constituido por una proporción variable de túbulos o estructuras denominadas hojas membranosas y dependiendo de la función celular pueden expresar mayoritariamente una estructura u otra. En células cuya principal función es la secreción, el RE está constituido principalmente por hojas membranosas, mientras que el RE de aquellas células especializadas en la síntesis de lípidos o señalización por  $Ca^{2+}$  está compuesto por una mayor proporción de túbulos [21]. El organelo de mayor tamaño es el RE, puesto que se distribuye desde la envoltura nuclear hasta la periferia celular. La envoltura nuclear es una bicapa lipídica que regula el intercambio de algunas moléculas como

ARN o proteínas entre el núcleo y el citoplasma. Por otro lado, las regiones del RE que se encuentran en cercanía con la MP están asociadas a vías de señalización de  $Ca^{2+}$  y con una importante relevancia en la señalización de lípidos. Destacablemente, la homeostasis de  $Ca^{2+}$  requiere una fina regulación para evitar tanto una excesiva liberación de  $Ca^{2+}$  del RE, así como un exceso de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma y las mitocondrias [23].

El valor normal de la  $[Ca^{2+}]_i$  es cercano a 100 nM, mientras que la concentración de  $Ca^{2+}$  en el lumen del RE ( $[Ca^{2+}]_{RE}$ ) es de 1000 a 10000 veces mayor (100  $\mu$ M a 1 mM) [21]. Sin embargo, la concentración de  $Ca^{2+}$  libre luminal del RE ( $[Ca^{2+}]_{RE-L}$ ) es ~200  $\mu$ M debido a que este ion se encuentra amortiguado principalmente por proteínas especializadas que difieren en su capacidad y afinidad por  $Ca^{2+}$  [24]. Principalmente en células no excitables, la liberación de  $Ca^{2+}$  del RE dispara un proceso denominado entrada de  $Ca^{2+}$  operada por depósito (SOCE, *Store-operated Calcium Entry*, por sus siglas en inglés), el cual se lleva a cabo en las uniones RE-MP [9, 25].

SOCE inicia cuando una disminución sustancial del  $Ca^{2+}$  en el lumen del RE provoca la oligomerización de las proteínas STIM que residen en la membrana del RE. STIM forma unas estructuras denominadas punctas que permiten el acercamiento entre la membrana del RE y la MP. STIM recluta y activa a los canales Orai que residen en la MP, induciendo una fuerte entrada de  $Ca^{2+}$  que tiene dos propósitos principales; sostener los incrementos de  $Ca^{2+}$  citoplásmico, así como permitir el relleno del RE a través de la bomba SERCA [25].

La disminución excesiva en la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  provoca diferentes daños, entre otros, proteínas chaperonas que necesitan el  $Ca^{2+}$  como cofactor para realizar su función correctamente, no pueden participar eficientemente en el control de calidad del RE, ocasionando un mal plegamiento de sus proteínas blanco.

Muchas enfermedades neurodegenerativas tienen como característica particular la acumulación de proteínas mal plegadas, así como agregados proteicos. En muestras de pacientes con la enfermedad de Alzheimer se encontró que en placas seniles había agregados extracelulares del amiloide  $\beta$ . En la enfermedad de Parkinson se han encontrado los llamados cuerpos de Lewy en el citoplasma neuronal, los cuales son depósitos de proteínas ubiquitinadas [26]. Por otra parte, en la enfermedad de esclerosis lateral amiotrófica, se ha observado que una mutación que aumenta la función de la enzima superóxido dismutasa provoca que ésta comience a agregarse. La acumulación de agregados proteicos de la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica fuertemente correlaciona con la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*, por sus siglas en inglés) así como con una mayor actividad de PERK. Estudios en ratones han revelado que inhibir la actividad de PERK reduce significativamente la neurodegeneración, por lo que ahora es de gran interés estudiar a PERK y UPR como agentes terapéuticos en diferentes enfermedades neurodegenerativas [26, 27].

### 3.2. Aparato de Golgi

A más de cien años de ser descubierto por el italiano Camillo Golgi, el Aparato de Golgi (AG) es uno de los organelos cuya función ha sido muy debatida y controversial [28]. Actualmente, el AG es considerado un organelo involucrado en diversos procesos celulares homeostáticos como el tráfico vesicular, la distribución y las modificaciones postraduccionales de las proteínas cargo o lípidos. De tal forma que, cambios estructurales y funcionales del AG pueden desencadenar diversas enfermedades como las neurodegenerativas, infecciosas y cardiovasculares (como la hipertensión pulmonar arterial), los accidentes cerebrovasculares isquémicos, y el cáncer [29].

El AG está organizado por cisternas que a su vez están divididas por tres regiones principalmente: la región Cis-, Medial- y Trans-Golgi. Cada una de estas regiones contiene diferentes enzimas de modificación proteica, las cuales catalizan la adición o remoción de azúcares, grupos sulfato o fosfato a la proteína cargo, actuando como señales para direccionar a la proteína a su destino final dentro de la célula [30].

Además de estas funciones del AG, se requiere que exista un adecuado microambiente homeostático de los iones tipo metal en las diferentes zonas del Golgi. Metales como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , son cofactores importantes de varias enzimas que participan en procesos de glicosilación residentes en este organelo. La homeostasis iónica en la vía secretora está finamente regulada y mantenida por transportadores que permiten llevar a cabo una función apropiada del AG y evitar respuestas de estrés, por lo que mutaciones en estos transportadores iónicos desencadenan estados patológicos en la célula [31].

En las últimas décadas, numerosas evidencias han aportado datos acerca de la participación del AG como un depósito intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo una de las primeras, los datos aportados por el grupo de Rizzuto mediante la medición directa de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el AG ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{AG}}$ ). Con el uso de una sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  basada en la proteína acuorina anclada a un péptido señal que permite dirigir el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  proteico hacia el AG, el grupo de Rizzuto demostró que este organelo mantiene un alta  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{AG}}$  en estado estacionario [32]. Con el paso del tiempo, la medición de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{AG}}$  ha mejorado con el desarrollo de nuevos indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  proteicos, que pueden ser dirigidos a las diferentes regiones del AG y de esta manera caracterizar la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  de este organelo [33–35]. Basado en todas las evidencias experimentales que se tienen hasta el momento, el modelo actual sugiere que la sección Cis-Medial del AG comparte similitud con el RE en la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  es activada por  $\text{IP}_3$  o cafeína, dependiendo del grado de expresión de los  $\text{IP}_3\text{R}$  o  $\text{RyR}$ , mientras que el mecanismo de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  es llevado a cabo por la bomba SERCA. Aunado a estos datos, se considera al AG como parte de los depósitos ácidos, ya que, a diferencia del RE, este organelo presenta un pH ácido. Sin embargo, en la región Trans del AG la propuesta es que el sistema de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  es realizado por el  $\text{RyR}$  en modelos que expresan primordialmente este canal mientras que la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  se lleva a cabo exclusivamente por SPCA (Figura 2) [36]. Por otra parte, el grupo de Alonso propone dos sub-compartmentos

de la región Trans, una de alta y otra de baja  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{AG}}$ , donde el primero de ellos captura  $\text{Ca}^{2+}$  vía la bomba SERCA mientras que el segundo es llevado a cabo por SPCA1 [33]. Adicionalmente, se ha observado que la región Trans del AG es un depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  lábil, ya que al remover el  $\text{Ca}^{2+}$  externo en la célula, la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{AG}}$  de la región Trans se reduce de manera inmediata y no así en la región Cis-Medial, sugiriendo que este compartimento del AG funcionaría como una estación temporal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula; sin embargo, aún falta por elucidar de manera detallada el mecanismo y la función de este reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  [37]. De manera interesante, se ha propuesto a la proteína TMEM165 como un transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  del Trans Golgi, teniendo un papel como intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ , no obstante, aún falta mucho por estudiar de este intercambiador [31].

Además de los transportadores y canales liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  en el AG mencionados anteriormente, es importante considerar las proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el lumen de este organelo, ya que tienen un papel esencial en la homeostasis de este ion dentro del lumen de AG. Las principales proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  identificadas en el AG son la nucleobindina-1 (conocida como CALNUC), Cab45 (proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de 45k Da), p54/NEFA y la Calumenina. La nucleobindina-1 es la proteína más abundante en la región Cis del AG así como la proteína amortiguadora de  $\text{Ca}^{2+}$  mejor caracterizada en este organelo, observando que la sobreexpresión de esta proteína se asocia con una mayor expresión del  $\text{IP}_3\text{R}$ , esto tiene como consecuencia un incremento del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  Cis-Golgi y como resultado una liberación mayor de  $\text{Ca}^{2+}$  ante la estimulación con ATP o  $\text{IP}_3$  [38]. Cab45 es una proteína soluble presente en el lumen del AG expresada de manera ubicua, recientes estudios muestran que esta proteína juega un papel central en los mecanismos de distribución de vesículas con proteínas cargo en conjunto con la actina del citoesqueleto citosólico así como la SPCA1 [39]. En el caso de la proteína p54/NEFA, fue identificada principalmente en la cisterna Medial del AG y vesículas asociadas al AG presentando una alta homología con nucleobindina-1, sin embargo, aún se encuentra en estudio la participación en el amortiguamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas regiones del AG. Por último, la calumenina es una proteína que no es exclusiva del AG sino que también se encuentra presente en el RE, por lo que evaluar su papel en el AG ha sido un gran reto [38].

En conjunto, todas las evidencias aportadas actualmente ponen al AG como un depósito fehaciente de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque con una complejidad mayor debido a la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  entre las diferentes secciones de este organelo. Entender la regulación de este ion en cada una de las zonas del AG así como la comunicación existente entre ellas, permitirá tener un conocimiento más detallado de enfermedades asociadas a una mala homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en el AG y de esta manera tener como principal objetivo el desarrollo de blancos terapéuticos.

### 3.3. Lisosomas

Adicional al AG, los lisosomas son también considerados por excelencia los reservorios ácidos de  $\text{Ca}^{2+}$ . El lisosoma es un organelo de una sola membrana con un pH muy bajo, entre 4.5 y 5.0. Este organelo contiene en su lumen más de sesenta enzimas hidrolíticas activas de tipo nucleasas, glicosilasas, fosfatasas, sulfatasas, lipasas y proteasas; es de interés destacar que se requiere de este ambiente ácido para que dichas enzimas tengan una actividad eficiente y esto es gracias al suministro de protones ( $\text{H}^+$ ) llevado a cabo por la bomba ATPasa vacuolar (ATPasa-V). Los lisosomas son considerados principalmente como el centro de eliminación de restos celulares, digiriendo así macromoléculas no deseadas, organelos dañados y senescentes, así como ciertos patógenos y otras partículas, llevándolo a través de la endocitosis, autofagia y fagocitosis. Una vez llevada a cabo la degradación, algunos productos como ácidos grasos libres, aminoácidos, monosacáridos y nucleótidos son transportados de vuelta por medio de exportadores específicos del lisosoma para su reutilización en los procesos anabólicos de la célula. Además de las hidrolasas luminales, el lisosoma también incluye un conjunto de proteínas integrales de membrana, así como proteínas asociadas a lisosomas, estas últimas representan aquellas que tienen una interacción dinámica con la superficie lisosomal bajo ciertas condiciones, como procesos de fusión y fisión [40, 41].

El proceso de autofagia es un mecanismo de supervivencia celular mediante el cual se lleva a cabo la degradación y el reciclamiento intracelular de materiales de desecho para el control de la homeostasis celular, observando que defectos en la autofagia desencadenan una variedad de estados patológicos, como el cáncer. Uno de los puntos de control clave para desencadenar el cáncer es una mala homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  lisosomal, teniendo en cuenta que el ion  $\text{Ca}^{2+}$  es un mensajero celular que está implicado en regular la supervivencia celular [42].

Si bien el lisosoma se ha destacado por ser el centro de reciclamiento celular, este organelo también es ampliamente conocido por ser un depósito ácido de  $\text{Ca}^{2+}$  con un papel regulatorio en la autofagia mediante la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vía los canales presentes en la membrana del lisosoma. Estos depósitos ácidos de  $\text{Ca}^{2+}$  lisosomal también abarcan estructuras como los endosomas terminales y organelos relacionados a lisosomas. En comparación con el volumen que ocupa en promedio el RE, estos organelos ácidos representan un volumen de 2 al 3% de la célula, lo cual sugiere que, aunque los lisosomas tienen una  $[\text{Ca}^{2+}]$  alta (500-600  $\mu\text{M}$ ), su contribución global al citoplasma es relativamente baja comparada con el RE, esto en células de mamífero primordialmente [43].

El mecanismo de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en los lisosomas no se ha definido de forma definitiva. Se propone que, en organismos como levaduras y plantas, la acidificación de las vacuolas tipo lisosomal generada por la ATPasa-V impulsa el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el lumen vacuolar a través del intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ . Sin embargo en células de mamífero, no se ha podido encontrar el gen del intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , sugiriendo la presencia de otros mecanismos de relleno de  $\text{Ca}^{2+}$  lisosomal en este tipo de organismos [44]. En este sentido, la mayoría de los estudios proponen que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el lisosoma se mantiene por una actividad de-

pendiente de la ATPasa-V, es decir, se requiere un ambiente ácido para llevar a cabo un relleno de  $\text{Ca}^{2+}$  al lumen del lisosoma, mientras que otros posibles candidatos como transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  es la bomba SERCA3 inhibida por 2,5-diterbutilbenzohidroquinona (TBHQ), la cual ha sido identificada en lisosomas de plaquetas y la proteína SLC24A5, un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$  presente en los melanosomas, cuyos organelos, responsables de la pigmentación, están relacionados a los lisosomas [43]. Por otro lado, Garrity y cols., sugieren que el ambiente ácido del lisosoma no es necesario para la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  sino que este mecanismo de relleno sería llevado a cabo por el  $\text{Ca}^{2+}$  que proviene directamente de RE a través del  $\text{IP}_3\text{R}$  de una manera directa hacia el lumen lisosomal [45].

En lo que respecta a los mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos ácidos hacia el citoplasma, se han identificado varios canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana de este organelo. Entre estos están los canales de 2 poros (TPCs, *Two Pore Channels*, por sus siglas en inglés) y TRPML1 (Figura 2). El primero de ellos es un canal catiónico no selectivo presente en el sistema endolisosomal, con dos isoformas TPC1 y TPC2. Estudios de *knockout* y *knockdown* han revelado que estos canales participan en la regulación del tráfico vesicular, y al interrumpirse estos mecanismos puede desencadenar enfermedades de almacenamiento lisosomal, metabólicas o infecciosas. Los TPCs pueden ser activados por varios estímulos endógenos como el fosfatidil 3,5-bifosfato ( $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ ) y el NAADP. El canal TRPML1 es una proteína de seis pasas transmembrana y pertenece a la superfamilia de los TRPs, ubicada en los endosomas tardíos y lisosomas con un contexto clínico muy interesante, ya que la pérdida de la función del TRPML1 puede ocasionar trastornos como la mucopolisidosis tipo IV (MLIV por sus siglas en inglés) [43]. Recientemente, el grupo de Krainc examinó fibroblastos de pacientes con MLIV y encontró que la dinámica de los contactos de membrana lisosoma-mitocondria se encontraban alterados acompañado de una deficiente captura de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de la mitocondria, esto por la pérdida de la función del TRPML1 [46]. A pesar de ser contemplado como el principal canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  lisosomal, el TRPML1 puede ser permeable a una gran variedad de cationes tales como  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . Se ha descrito que los agonistas y antagonistas naturales de este canal son los fosfatidilinositoles, sin embargo, existe un agonista sintético llamado ML-SA-1 que ha permitido estudiar a detalle la actividad de este canal [47], el cual se propone que tiene un papel como regulador en la autofagia celular [48]. Otros canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en los lisosomas incluyen al CCDV conocido como CACNA1A, se piensa que en neuronas es un mediador de la difusión. Por último, se ha propuesto al P2X4 como un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  lisosomal inhibido a pH bajo sugiriendo que su actividad como canal de  $\text{Ca}^{2+}$  está relacionada con la inducción de la exocitosis lisosomal, por ejemplo, facilitando la secreción de surfactante de células alveolares tipo II, sin embargo, aún faltan varios estudios por realizar para la caracterización del papel de estos dos últimos canales en la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  lisosomal [43].

### 3.4. Gránulos de secreción

Los gránulos de secreción están presentes en células exocrinas, endocrinas y neuronales. Su formación se inicia a partir de la red del Trans Golgi (TGN, por sus siglas en inglés), teniendo como resultado la secreción de proteínas empacadas de manera concentrada en las vesículas secretoras [49]. El proceso de secreción celular debe estar finamente regulado ya que es fundamental en diversos tipos celulares del orden eucariótico, ocupando un lugar central la exocitosis desencadenada por el ion  $\text{Ca}^{2+}$  [50].

La historia del papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la secreción inicia cuando se observó por primera vez que la secreción de neurotransmisores dependía de la presencia de este ion. En células glandulares, los estudios del grupo de Douglas y Rubin establecieron que la secreción endocrina era absolutamente dependiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, sin embargo, en trabajos posteriores, demuestran que en glándulas salivares la secreción exocrina podría ser producida en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, pero no puede mantenerse este proceso exocrino a menos que el  $\text{Ca}^{2+}$  externo esté presente [51].

Actualmente, es claro que todas células secretoras, ya sea nerviosas, endocrinas o exocrinas, requieren la presencia de ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Si realizamos una comparación entre los mecanismos llevados a cabo por las células exocrinas y endocrinas, por ejemplo, las células de acino pancreático y las células  $\beta$  secretoras de insulina, se observa que presentan rutas radicalmente diferentes para llevar a cabo los procesos de secreción, a pesar de que en ambos casos están involucrados el ion  $\text{Ca}^{2+}$  y el ATP. En el caso de las células  $\beta$  secretoras de insulina, el paso inicial después de haberse llevado a cabo la captura de glucosa es la producción de ATP debido al metabolismo de este azúcar, resultando un incremento en el cociente ATP/ADP, esto reduce la probabilidad de apertura de canales de  $\text{K}^+$  sensibles a este cociente, resultando en la despolarización de la membrana. Este cambio de potencial de membrana induce la apertura de canales de CCDV causando así un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma, lo que resulta en un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y por ende la activación de la secreción de la hormona insulina. En el caso de las células del acino pancreático, la secuencia de eventos es muy diferente, siendo el primer paso, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares evocado por el estímulo. Parte de este incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es capturado por la mitocondria activando las deshidrogenasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el ciclo de Krebs, incrementando así la producción de ATP. Como se puede observar, no hay un incremento primario de la conductancia de membrana en este tipo celular pero el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  generado por la liberación del RE permite la activación de los canales  $\text{Cl}^-$  presentes en la membrana apical secretora, los cuales tienen un papel importante para la secreción de fluido, vital para la secreción exocítica de las pro-enzimas digestivas [51].

Por otro lado, respecto a las células neuronales y neuroendocrinas, es bien conocido que incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  disparan la exocitosis de un conjunto de vesículas secretoras que se encuentran ancladas de manera transitoria a la membrana aceptora de la MP, controlado por factores de anclaje como los complejos v-SNARE, t-SNARE y las GTPasas de Rab. Estos gránulos,

además de estar anclados a la MP, también se encuentran en alta cercanía del RE y la mitocondria, asumiendo así que las fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  requeridas para llevar a cabo la exocitosis puede ser por el  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente del medio extracelular a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la MP o  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a través del  $\text{IP}_3\text{R}$  o RyR. El  $\text{Ca}^{2+}$  de las mitocondrias que se encuentran en cercanía con estas vesículas puede también contribuir, de una manera muy local, en la fusión y secreción vesicular. En lo que respecta a los gránulos de secreción como depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  y su función en la vía exocítica, así como los aspectos de homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , mecanismos de liberación y captura, existe aún gran controversia. Por supuesto que, una posibilidad atractiva sería que el  $\text{Ca}^{2+}$  intergranular pudiera contribuir a su propio mecanismo de secreción, siendo liberado a través de canales presentes en la membrana del gránulo de secreción. A continuación, se describen evidencias de lo que se conoce actualmente sobre los gránulos de secreción como un depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  [52].

Diversos estudios han tratado de evaluar la  $[\text{Ca}^{2+}]$  total, por ensayos de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , así como de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, encontrando que el  $\text{Ca}^{2+}$  total presente en los gránulos de secreción puede abarcar rangos de 20 a 40 mM, es decir, concentraciones mayores a las del RE. No obstante, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre de los gránulos de secreción ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GS}}$ ) presenta valores que van de 20 a 100  $\mu\text{M}$ , esto obtenido del estudio de diferentes tipos celulares como células cromafines, MIN6, INS, PC12, vesículas sinápticas neuromusculares, entre otras. Estos valores de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GS}}$  son significativamente bajos, cerca de un orden de magnitud, comparado con la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ , el cual es alrededor de 500  $\mu\text{M}$ . Dado que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  total es más alta en vesículas de secreción comparada con la del RE, esto significa que la relación de  $\text{Ca}^{2+}$  unido/ $\text{Ca}^{2+}$  libre es mucho más alta en las vesículas que en el RE, arrojando la interrogante sobre dónde se encuentran estos sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  en este tipo de compartimentos. Actualmente, la idea es que, la capacidad alta que tienen estas vesículas por almacenar altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se debe principalmente a las proteínas cromogranina A y B y la secretogranina. Por ejemplo, en células cromafines, la cromogranina A constituye cerca del 90% de estas proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  con una Kd de 4 mM. En conjunto, el  $\text{Ca}^{2+}$  en los gránulos secretores puede estar de manera estable, de tal forma que sea importante para la estructura de los componentes granulares, a su vez, puede estar unidos a proteínas como las cromogranina con una afinidad cercana a la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GS}}$  fácilmente disponible para el intercambio, cuyo tamaño puede depender de las variaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  u otras condiciones celulares. El tamaño de estos depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  granulares dependerá del tipo de vesícula y de las condiciones celulares [52].

Dado que la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GS}}$  es del rango de 20-100  $\mu\text{M}$ , es muy probable que existan mecanismos de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el lumen de las vesículas secretoras, teniendo en cuenta que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  basal en el citoplasma es 1000 veces menor. Mediante diversos estudios experimentales, se han propuesto algunos candidatos que podrían estar participando en estos mecanismos de remoción como: la presencia de un NCX en células cromafines de bovino; un intercambio acoplado de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  por medio de la generación de un gradiente de  $\text{H}^+$  de la ATPasa-V con el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  propuesto en fantasmas de gránulos cromafines; sin embargo,

este mecanismo aún es debatido debido a que el gradiente generado por  $\text{Na}^+$  no es muy grande para llevar a cabo un mecanismo de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  eficiente. Otra posibilidad es la presencia de la bomba SERCA en la membrana de las vesículas secretoras, ya que se ha observado que el inhibidor TBHQ inhibe la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  en vesículas sinápticas aisladas, además, en plaquetas se ha observado que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en un conjunto de depósitos ácidos de  $\text{Ca}^{2+}$  es controlada por un intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  y una bomba SERCA3 sensible a TBHQ. La bomba SERCA parece ser un buen candidato como mecanismo de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en los gránulos de secreción, ya que diversos estudios han mostrado la sensibilidad de estos depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  a la taspigargina o TBHQ en varios tipos celulares como gránulos densos de insulina de células pancreáticas de ratón, células cromafines, líneas celulares como PC12 y INS, aunque en células como MIN6 se ha mostrado la insensibilidad a la taspigargina, sugiriendo la presencia de otra ATPasa como la SPCA. Se han realizado estudios proteómicos en algunos tipos celulares con la intención de identificar qué proteínas de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían estar involucradas en los gránulos de secreción, los resultados han mostrado que en gránulos secretores de células cromafines podría estar implicado un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$  y la SERCA2 en vesículas de secreción de células NIT-1 de insulinoma [52].

Con relación a los canales liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en este tipo de depósitos ácidos, la mayoría de las evidencias proponen al  $\text{IP}_3\text{R}$  como el candidato general, caracterizado muy bien en vesículas secretoras de células cromafines. Aunque también se ha observado en líneas celulares neurosecretoras como PC12 e INS1 que tanto el  $\text{IP}_3$  como agonistas formadores de  $\text{IP}_3$  liberan  $\text{Ca}^{2+}$  de estos depósitos. En discrepancia con estos datos, en el modelo de plaquetas, el  $\text{IP}_3\text{R}$  está presente en el sistema denso tubular, que es la estructura equivalente al RE, y no en los gránulos ácidos. Estudios en células MIN6 secretoras de insulina han mostrado liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los gránulos de secreción ante estímulos como la ADP-Ribosa cíclica (ADPRC) y la cafeína, sugiriendo la presencia de RyRs en estos compartimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  granulares. Otros de los candidatos propuestos son los TPCs, ya que se ha observado que el NAADP puede inducir de manera efectiva la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de vesículas secretoras de células como plaquetas, MIN6 y PC12 [52].

### 3.5. Mitocondria

Antes de considerarse al RE como el principal reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de las células, a principios de la década de los sesenta, diversos hallazgos colocaban a la mitocondria como el organelo encargado de llevar a cabo esta función. Esto se sugirió a partir de trabajos en los cuales, utilizando mitocondrias aisladas de riñón, éstas eran capaces de acumular grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un mecanismo dependiente del potencial de membrana mitocondrial [53]. Años después se observó que la acumulación de grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial en conjunto con el fosfato formaban gránulos electrodensos que correspondían a precipitados insolubles de fosfato. Interesantemente, estos mismos precipitados era común encontrarlos en mitocondrias de diferentes tejidos que experimentaban algún padeci-

miento como isquemia o fibrilación ventricular, por mencionar algunas [54]. Por lo tanto, las grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  acumuladas en la mitocondria sólo ocurren en condiciones patológicas, por lo que esto es incompatible con la idea de que la mitocondria sea el principal reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células.

Hoy en día, a pesar de que la mitocondria puede acumular  $\text{Ca}^{2+}$  en su interior, no se considera como tal un depósito intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , de hecho, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en reposo dentro de la mitocondria son bajos, similares a los del citoplasma [54], más bien, este organelo desempeña un papel importante en amortiguar los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma o bien, capturar el  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente del RE liberado vía el  $\text{IP}_3\text{R}$  gracias a la cercanía existente entre ambos organelos [55]. Para ello, la membrana interna mitocondrial está provista de un complejo multiproteico conocido como uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial o MCU por sus siglas en inglés. Este complejo está formado por diferentes proteínas que en conjunto regulan finamente la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria [56], de lo contrario ocurre una acumulación excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  que conduce a la apertura del poro de transición, la liberación de factores proapoptóticos y finalmente a la muerte celular [55] (Figura 2).

La identificación de todos los elementos de la maquinaria de MCU tomó cerca de cincuenta años [56] y esto fue posible en gran medida al desarrollo de bases de datos como MitoCarta que recopilan información de un gran número de proteínas mitocondriales, así como su posible función. El tamizaje a través de MitoCarta condujo en el año 2010 a la identificación de MICU1, la proteína que en estado de reposo mantiene cerrado el canal, y un año después a MCU, la unidad formadora del poro. Años más tarde se describieron proteínas como MCUB, MICU2, MICU3 y EMRE [56, 57].

MCU estructuralmente consta de dos dominios transmembranales unidos entre sí por un asa de aminoácidos cargados negativamente, esto es importante pues estos aminoácidos (glutamatos) son los encargados de conferirle la alta selectividad por  $\text{Ca}^{2+}$  y permiten el paso de este ion a través del canal, aunado a que el potencial de membrana de la mitocondria es de al menos  $-180$  mV (lo que aporta energía cinética para la disociación del ion  $\text{Ca}^{2+}$  del filtro de selectividad del canal MCU). En el caso de MCUB estos aminoácidos se encuentran mutados, por lo que esta subunidad impide la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  funcionando como dominante negativa del canal. MICU1, MICU2 y MICU3 son proteínas con dominio mano EF que a concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  (500 nM) inhiben la actividad de MCU, previniendo así la entrada excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  [56, 57]. De hecho, la ausencia de MICU1 conduce a alteraciones durante el desarrollo embrionario en ratones debido a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  [58]. Por otra parte, la función inicial de EMRE fue sugerida como proteína de andamiaje encargada de mantener ensamblado el complejo, sin embargo, recientemente se ha propuesto que EMRE regula la actividad de MCU al sensar los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la matriz mitocondrial, evitando así la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  [56, 57]. Finalmente, para evitar completamente la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , la mitocondria requiere de mecanismos de extrusión para remover el  $\text{Ca}^{2+}$  de la matriz mitocondrial, función que se lleva a cabo gracias a la actividad del NCX. En conjunto, este gradiente de  $\text{Na}^+$  aunado al potencial negativo de la membrana mitocondrial impulsan la remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  de la matriz mitocondrial [59].

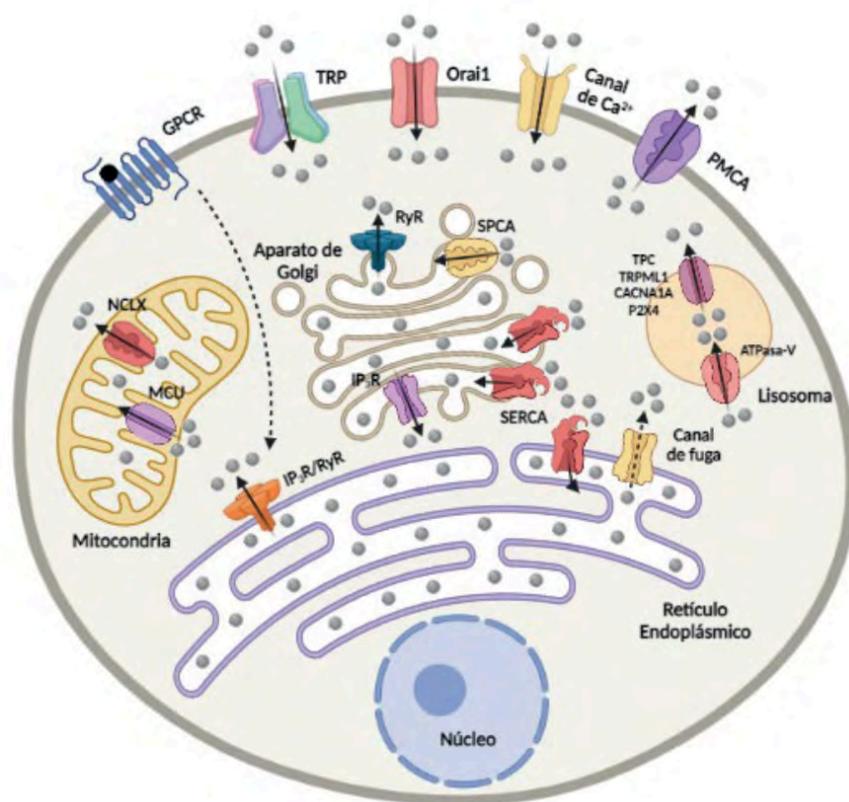


Figura 2. Los diferentes organelos de la célula también participan en la regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$ , al ser depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Los canales permeables a  $Ca^{2+}$  presentes en la membrana plasmática (TRPs, Orai1, Canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, entre otros) permiten el influjo de  $Ca^{2+}$  del medio extracelular hacia el interior de la célula. A su vez, la liberación de  $Ca^{2+}$  de compartimentos intracelulares contribuyen para generar incrementos transitorios de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma. El retículo endoplásmico es el principal depósito de  $Ca^{2+}$  en las células; sin embargo, depósitos de  $Ca^{2+}$  de naturaleza ácida como el aparato de Golgi y los lisosomas pueden liberar  $Ca^{2+}$  (por  $IP_3R$  o canales TPC, respectivamente), generando un impacto significativo en el  $Ca^{2+}$  citoplásmico. Estos incrementos transitorios en los niveles de  $Ca^{2+}$  citoplásmico ocurren dentro de las células, lo que resulta en la modificación de la función celular. Al mismo tiempo están presentes diferentes mecanismos de remoción que se encargan de reducir la  $[Ca^{2+}]_i$  y mantenerla en rangos de 100 nM. Éstos involucran la participación de ATPasas de la membrana plasmática o mecanismos de captura en los compartimentos intracelulares (SERCA, SPCA o MCU). Aunque la mitocondria no se considera un depósito de  $Ca^{2+}$ , ésta puede acumular  $Ca^{2+}$  gracias al MCU. De manera general, ambos mecanismos (canales y bombas) actúan de manera secuencial para producir incrementos transitorios de la  $[Ca^{2+}]_i$  y así modificar la conducta celular sin tener consecuencias adversas debidas al incremento exagerado o prolongado de la  $[Ca^{2+}]_i$ . GPCR, receptor acoplado a proteínas G;  $IP_3R$ , receptor de  $IP_3$ ; MCU, uniportador de  $Ca^{2+}$  mitocondrial; RyR, receptor de rianodina; SERCA, ATPasa de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico; SPCA, ATPasa de  $Ca^{2+}$  de la vía secretora; TPC, canal de dos poros; TRP, canal iónico receptor de potencial transitorio. Imagen elaborada con BioRender.com.

#### 4. Arsenal de proteínas involucradas en la señalización por $Ca^{2+}$

##### 4.1. Amortiguamiento del $Ca^{2+}$ intracelular

El  $Ca^{2+}$  dentro de la célula está en dos estados, libre o unido a proteínas, la mayoría del Ca está unido a proteínas y sólo una fracción minúscula está libre en la célula. Se piensa que el  $Ca^{2+}$  libre está en equilibrio con el  $Ca^{2+}$  unido a proteínas, de tal forma que el transporte del  $Ca^{2+}$  entre los diferentes compartimentos modifica la  $[Ca^{2+}]_i$  libre y el  $Ca^{2+}$  pegado a proteínas se reduce o aumenta según sean los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  libre. Por otro lado, es importante señalar que la  $[Ca^{2+}]_i$  no está en equilibrio sino más bien se mantiene estable debido a un estado estacionario que involucra el consumo constante de energía en forma de ATP. Los

dos elementos críticos de este estado estacionario son la fuga de  $Ca^{2+}$  y la actividad de las diferentes bombas de  $Ca^{2+}$ . La naturaleza molecular del canal iónico responsable de la fuga de  $Ca^{2+}$ , es decir de la entrada constante de  $Ca^{2+}$  al citoplasma, se desconoce. Debido a que la actividad de los canales iónicos nunca es cero, esto implica que la naturaleza de la fuga de  $Ca^{2+}$  depende del arsenal de canales iónicos permeables al  $Ca^{2+}$  y número de canales expresados por el tipo de célula; por lo tanto, la fuga de  $Ca^{2+}$  es diferente entre los distintos tipos de células como los miocitos cardíacos, hepatocitos, fibroblastos, neuronas, y demás células. La importancia de la magnitud de la fuga de  $Ca^{2+}$  se debe a que esto determina la cantidad de energía que la célula invierte para mantener la  $[Ca^{2+}]_i$  baja y estable a través de la actividad de las diferentes bombas de  $Ca^{2+}$ . Si la célula no tiene energía para reducir la  $[Ca^{2+}]_i$ , esto conlleva al daño mitocondrial y muerte celular [24, 60] (Figura 1).

Las proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  se pueden clasificar de dos tipos principales, como amortiguadoras o receptores intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las proteínas amortiguadoras atrapan el  $\text{Ca}^{2+}$  para disminuir su concentración libre y permitir que los sistemas de bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  remuevan de forma definitiva el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  según su velocidad de recambio. Ejemplos de estas proteínas serían la parvalbumina y la calbindina. Las proteínas que son receptores de  $\text{Ca}^{2+}$  también unen a este ion, pero sufren cambios conformacionales que a su vez afecta la actividad de otras proteínas. Ejemplos de estas proteínas serían la CaM y la troponina C [61].

#### 4.2. Receptores intracelulares del ion $\text{Ca}^{2+}$

Los receptores intracelulares del ion  $\text{Ca}^{2+}$  son proteínas capaces de unirse al  $\text{Ca}^{2+}$  a pesar de que haya una concentración elevada de  $\text{Mg}^{2+}$  (de 1 mM o más). Hay tres tipos de dominios proteicos especializados en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , el dominio mano EF, el dominio C2 y proteínas especializadas capaces de unirse a  $\text{Ca}^{2+}$  que realizan una función similar a una esponja de  $\text{Ca}^{2+}$  al unirse a este ion [62].

Los dominios C2 han evolucionado como dominios dependientes e independientes del  $\text{Ca}^{2+}$  con funciones muy versátiles. Se piensa que los dominios C2 que no responden a  $\text{Ca}^{2+}$  podría tener funciones únicamente estructurales o que en algún momento perdieron la capacidad de responder al  $\text{Ca}^{2+}$ , esto abre la posibilidad de que el dominio C2 tenga funciones que no han sido descritas hasta ahora. El dominio C2 está formado por 130 residuos de aminoácidos y puede unirse de 2 a 3 iones de  $\text{Ca}^{2+}$  gracias a cadenas bilaterales de aspartatos, estos dominios fueron descubiertos por primera vez en la proteína cinasa C (PKC) [63].

PKC es una proteína que fosforila diversos blancos celulares, activando e inactivando diferentes cascadas de señalización, lo que revela la importancia evolutiva que tiene el dominio C2. Lo que se sabe hasta ahora de los dominios C2 se ha estudiado principalmente en PLC $\delta$ 1, PKC, cPLA2 y sinaptotagmina I [63, 64]. C2 se ha considerado como un dominio de unión a lípidos dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , esto debido a que, en la sinaptotagmina I, la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a C2 favorece su unión a fosfolípidos, esto resulta interesante ya que ni el  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  o  $\text{Sr}^{2+}$  modificaron positivamente su afinidad por fosfolípidos [64].

Otras proteínas que son capaces de unirse a  $\text{Ca}^{2+}$  han evolucionado expresando típicamente un motivo estructural tipo hélice-bucle-hélice, denominado “mano-EF”. Los dominios mano-EF regularmente son expresados en pares; por lo que muchas proteínas que pertenecen a esta familia presentan dos, cuatro o seis dominios mano-EF. Las proteínas con dominio mano-EF pueden ser clasificadas en dos grupos; los sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  y los amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mientras que los sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  son proteínas que traducen un incremento o disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en diversas señales bioquímicas, los amortiguadores son proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma para reducir la concentración de este ion y evitar daño celular [65].

Un ejemplo clásico de receptores intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  es la CaM. La CaM es una proteína pequeña (149 aminoácidos) que está codificada por tres genes diferentes localizado en tres cromosomas diferentes y se transcriben en al menos ocho diferentes ARNm con diferentes señales de poliadenilación, esto refleja la

importancia de contar con esta proteína en las células. La proteína CaM presenta varias modificaciones postraduccionales, principalmente la fosforilación de treoninas (26, 29, 44, 79 y 117) de serina (81 y 101) y de tirosina (99 y 138), acetilación de la alanina del N-terminal, la trimetilación de la lisina 115 y el corte proteolítico en el C-terminal. Todas estas modificaciones afectan su actividad como receptor de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. La CaM tiene dos manos EF en el N-terminal y dos manos EF en el C-terminal, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene una forma globular, pero en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  toma una forma de pesa de mancuerna donde la parte central interactúa con las diferentes proteínas blanco (Figura 3). La alta afinidad de las manos EF se debe a la cooperatividad entre dos de ellas, así el par de manos EF del C-terminal de la CaM muestra una mayor afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  que el par que se encuentra en el N-terminal. Además, la afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  de la CaM no es una propiedad intrínseca de la proteína, ya que la presencia de sus proteínas blanco (cinasa II dependiente de CaM, la cinasa de la cadena pequeña de la miosina del músculo esquelético y la fosfatasa 2B) aumentan la afinidad de la CaM por  $\text{Ca}^{2+}$  y la CaM con o sin  $\text{Ca}^{2+}$  se puede unirse a dichas proteínas blanco con diferentes afinidades. En resumen, la interacción de la CaM con sus proteínas blanco es un proceso muy dinámico. El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM puede interactuar con diferentes proteínas ocasionando que estas últimas liberen sus dominios autoinhibitorios y así provocando su activación dependiente del ion  $\text{Ca}^{2+}$  [65–67]. La proteína STIM es otro ejemplo de sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  (con una sola mano EF y por lo tanto con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ ) que mantiene una conformación inactiva cuando su dominio mano-EF tiene unido al menos un ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  disminuye, este ion se disocia provocando cambios conformacionales que le permiten interactuar y activar a los canales Orai1 [68]. Principalmente en células no excitables, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por STIM y Orai regula diferentes procesos celulares que activan o inhiben diversas cascadas de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  [68].

#### 4.3. Efectores intracelulares del ion $\text{Ca}^{2+}$

Los incrementos en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula desencadenan eventos moleculares que son importantes para la regulación de diversas funciones celulares. Sin embargo, para que esto ocurra, las células experimentaron procesos de evolución que les hicieron contar con proteínas capaces de unirse a  $\text{Ca}^{2+}$ , y que a la postre modifican la conducta celular.

Uno de los mejores ejemplos, descritos previamente, es la participación de  $\text{Ca}^{2+}$  y su unión a la proteína CaM, para llevar a cabo la regulación de diferentes vías de señalización (revisar sección 4.2). Esta interacción promueve que el sitio regulatorio de la cinasa dependiente de CaM no bloquee la actividad de fosforilación y entonces se promueva su autofosforilación, estado en el que esta cinasa se encuentra activa. La activación de esta cinasa promueve la liberación de neurotransmisores que son importantes para la memoria y aprendizaje, además de regular el metabolismo de glucosa y la señalización por insulina, por mencionar algunos ejemplos [67]. Otra enzima regulada por el complejo de  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM es la Calcineurina, una fosfatasa de serina/treonina que posee un

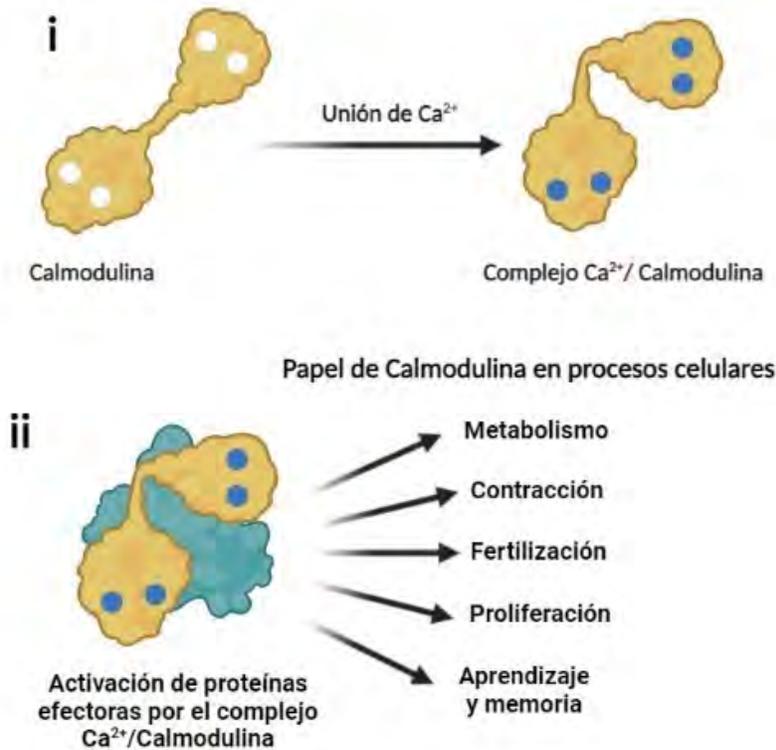


Figura 3. La calmodulina es el prototipo de receptor intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que modifica la actividad de otras proteínas lo que a su vez resulta en modificaciones de un gran número de vías de señalización. *i*) Calmodulina posee cuatro dominios mano-EF (círculos blancos) que están formando lóbulos (pares de manos EF con afinidades similares a  $\text{Ca}^{2+}$ ). En el caso de la calmodulina el lóbulo C-terminal tiene mayor afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$  que el localizado en el N-terminal. Incrementos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  promueve la transición de apocalmodulina al complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina lo que lleva aparejados cambios conformacionales evidentes en la calmodulina. *ii*) El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina interactúa con diferentes proteínas blanco (canales iónicos, proteínas transportadoras, cinasas, fosfatasas, proteasas, etc.) y esto modifica a su vez la actividad de estas últimas, lo que resulta en la activación de diferentes procesos celulares como contracción muscular, fertilización, metabolismo, aprendizaje, entre otros. Imagen elaborada con BioRender.com.

dominio catalítico y uno regulatorio. En estado de reposo, ambos dominios se encuentran interaccionando en un estado inactivo, sin embargo, la interacción del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM con calcineurina promueve la activación de la fosfatasa [69]. Una vez en su forma activa, esta enzima desfosforila proteínas que a su vez regulan vías de señalización como la activación y diferenciación de células T, diferenciación de músculo esquelético, y en procesos de plasticidad neuronal [70].

Además de los ejemplos descritos, existe una gran variedad de proteínas las cuales su actividad está modificada por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, por ejemplo; la cinasa de la cadena pequeña de la miosina, la adenilil ciclasa 1, la sintasa de óxido nítrico 1, entre otras. Esto sólo es una descripción breve de cómo el  $\text{Ca}^{2+}$  modifica la actividad de ciertas proteínas y éstas a su vez la función celular. Sin embargo, los ejemplos que se describen a continuación abordan con mayor profundidad el papel que tiene el  $\text{Ca}^{2+}$  en diferentes funciones celulares.

## 5. Procesos bioquímicos subyacentes en la señalización por $\text{Ca}^{2+}$ de diferentes respuestas celulares

### 5.1. Contracción muscular

Los músculos son los tejidos que nos permiten mover nuestro cuerpo. Hay tres tipos diferentes de músculos: estriado voluntario, cardíaco y liso. Los tres tipos se contraen en respuesta a un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y en los tres casos, el  $\text{Ca}^{2+}$  tiene el mismo mecanismo para producir la contracción muscular. Este mecanismo básico consiste en que el ion  $\text{Ca}^{2+}$ , de forma indirecta, activa una ATPasa conocida como miosina que, mediante la hidrólisis de ATP, lleva a cabo su propio desplazamiento sobre un riel de actina, lo que resulta en el acortamiento celular o contracción muscular. Tanto el tipo de miosina que expresa cada tipo de célula muscular como los mecanismos utilizados para producir un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  varían [71].

El músculo estriado voluntario está formado por células sincitiales conocidas como fibras musculares, que llegan a tener dimensiones descomunales en comparación con el resto de las

células del cuerpo humano. Dicho tamaño establece un reto para lograr un incremento global y simultáneo de la  $[Ca^{2+}]_i$  y así una contracción efectiva. Este reto se soluciona usando al RS como el depósito intracelular de  $Ca^{2+}$  que llega a todos los rincones de las fibras musculares. Su enorme tamaño le permite que cada monómero esté en contacto físico con el CCDV de la membrana plasmática, la cual tiene invaginaciones conocidas como túbulos T, que llevan al CCDV al interior de la fibra muscular para establecer la unión con el RyR. Este acople se le conoce como acople mecánico, puesto que la liberación de acetilcolina en la placa neuromotora, despolariza la membrana plasmática y produce cambios conformacionales en el CCDV que son transmitidos directamente al RyR debido a la interacción entre estas dos proteínas. La apertura del RyR facilita la salida de  $Ca^{2+}$  del RS y este ion a su vez interacciona con la troponina C, una proteína con manos EF (dominios de unión a  $Ca^{2+}$ ), lo que facilita que la miosina se active y se desplace por el riel de actina [17, 20].

El músculo cardíaco es un músculo estriado involuntario. Sus fibras también son grandes, rebasan las 150  $\mu m$  de longitud y por lo mismo dependen de la salida de  $Ca^{2+}$  del RS y de los túbulos T para producir la contracción adecuada. En este caso, el CCDV de la MP está localizado en las cercanías del RyR sin presentar contacto directo como en el caso del músculo esquelético. Los CCDV activan al RyR por el mecanismo conocido como CICR. Este mecanismo consiste en que la despolarización de la membrana plasmática (por el marcapaso propio del corazón) activa los CCDV y permite una pequeña entrada de  $Ca^{2+}$ , éste a su vez activa al RyR del RS y por el mecanismo de CICR se logra liberar alrededor de diez veces más de  $Ca^{2+}$  al citoplasma y es este último, que viene del RS, el que dispara la contracción de los miocitos cardíacos [17, 20].

El músculo liso, como su nombre lo dice, no presenta estriaciones cuando se observa al microscopio óptico, esto debido a que la disposición de actina y miosina (las proteínas contráctiles) no está organizada de forma regular como en el caso de los músculos estriados. El músculo liso es autónomo y está involucrado en el movimiento de órganos huecos y tubulares (vasos sanguíneos, vías aéreas, aparato digestivo, vejiga, útero, etc.). Las células de músculo liso (CML) tienen un tamaño menor que los miocitos cardíacos o las fibras musculares, por lo mismo el papel del RS, como fuente de  $Ca^{2+}$  para inducir la contracción, es minoritario en los miocitos lisos. La principal fuente de  $Ca^{2+}$  es el medio extracelular que gana acceso al citoplasma al activarse los canales permeables al  $Ca^{2+}$  de la MP. Otra diferencia con los músculos estriados es que la despolarización de la MP no es el único mecanismo para inducir la contracción del músculo liso. Una tercera diferencia sería que el sensor de  $Ca^{2+}$  citosólico es la troponina C en el caso de los músculos estriados, pero en el músculo liso es la CaM. Por último, la contracción en el músculo liso es más lenta que la contraparte estriada debido a que la unión de  $Ca^{2+}$  a CaM activa una cinasa de la cadena pequeña de la miosina (MLCK *myosine light chain kinase*, por sus siglas en inglés) la que a su vez fosforila a MLC lo cual permite la activación de la miosina, llevándose a cabo el mismo proceso de hidrólisis de ATP para el desarrollo de la contracción. Sin embargo, esta diferencia ocasiona que el músculo liso sea más lento que sus contrapartes estria-

das, pero que pueda mantener la contracción por tiempos prolongados sin necesidad de un incremento sostenido de la  $[Ca^{2+}]_i$ , esto debido a que se requiere la activación de una fosfatasa para desfosforilar a la proteína MLC y así apagar a la miosina y por lo tanto permitir la relajación muscular. Si la proteína MLC está fosforilada, el músculo liso se mantiene contraído independientemente de que la  $[Ca^{2+}]_i$  haya regresado a sus niveles en reposo. En el caso de los músculos estriados, el  $Ca^{2+}$  tiene que estar unido a la troponina C para que se active la miosina, y esto implica que la  $[Ca^{2+}]_i$  debe estar elevada todo el tiempo que se requiera mantener la contracción. Esta diferencia es importante porque un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  de forma prolongada conlleva a la fatiga en el músculo estriado y la muerte celular en los miocitos cardíacos. Las CML presentan receptores a una extensa gama de agonistas, entre los que se encuentran, la adrenalina, la acetilcolina, la angiotensina II, la histamina, la oxitocina, la serotonina, entre otros. Por lo general estos receptores están acoplados a la hidrólisis del fosfolípido  $PIP_2$ , lo que resulta en la generación de dos segundos mensajeros, el  $IP_3$  y el DAG. El  $IP_3$  incrementa la  $[Ca^{2+}]_i$  al activar al  $IP_3R$  del RS; sin embargo, este  $Ca^{2+}$  tiene un impacto muy pequeño en la contracción del músculo liso en respuesta a los agonistas que producen  $IP_3$  cuando se estimulan estos receptores en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo. Los diferentes inhibidores de los CCDV indican que éstos son la principal vía para incrementar la  $[Ca^{2+}]_i$  y producir contracción en el músculo liso. Sin embargo, desconocemos el mecanismo molecular mediante el cual los agonistas inducen la despolarización de la MP y la activación de los CCDV. Las CML expresan una gran cantidad de los canales de potasio activados por  $Ca^{2+}$  de conductancia grande (BKCa) en la membrana plasmática, estos canales están en cercanía a los RyR, lo cual tiene efectos muy importantes en el tono miogénico y en la relajación del músculo liso en general. El tono miogénico de los vasos sanguíneos involucra un ciclo continuo de liberación y recaptura de  $Ca^{2+}$  por el RS que modula la actividad de los CCDV. La distensión de las CML activa canales mecano-sensibles que al despolarizar a la MP producen la activación de los CCDV y la entrada de  $Ca^{2+}$  al citoplasma, pero debido a la presencia del RS en cercanía con la MP (aproximadamente 30 nm), esta entrada de  $Ca^{2+}$  causa la sobrecarga con  $Ca^{2+}$  del RS, esta sobrecarga aumenta la frecuencia de eventos de liberación de  $Ca^{2+}$  por la activación rápida y limitada de los RyR generando lo que se conoce como chispas de  $Ca^{2+}$  (*sparks*, en inglés) las cuales, debido a su cercanía con la MP, activan un clúster de canales BKCa, esto a su vez hiperpolariza la MP lo que resulta en la desactivación de los CCDV. La menor actividad de estos canales disminuye la entrada de  $Ca^{2+}$  al citoplasma, lo que reduce la cantidad de  $Ca^{2+}$  dentro del RS y esto disminuye la frecuencia de las chispas de  $Ca^{2+}$  lo que termina desactivando a los canales BKCa. Si el estímulo mecánico sigue presente, se reactivan los canales mecano-sensibles y debido a que los canales BKCa están desactivados, se reinicia el mismo ciclo y de esta forma se mantiene un tono miogénico responsable de la presión arterial periférica. En resumen, el ion  $Ca^{2+}$  tiene un papel dual en el músculo liso ya que lo mismo produce contracción como relajación. La diferencia es la magnitud y la localización de la señal de  $Ca^{2+}$ . Un incremento global de la  $[Ca^{2+}]_i$  produce la contracción, mientras que un incremento pequeño y localizado

en el citoplasma que está cerca de la MP, origina la activación de los canales BKCa y por lo mismo la relajación del músculo liso vascular. La modulación de la actividad de los CCDV o de los canales BKCa nos permite regular la presión arterial en pacientes hipertensos [71, 72].

## 5.2. Secreción glandular

El páncreas es una glándula muy importante en la digestión. La porción exocrina secreta diferentes enzimas digestivas en respuesta a un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , mientras que la parte endocrina, llamada islotes de Langerhans, está conformada por cúmulos de diferentes tipos de células. Una de estas células serían las células  $\beta$ , que tienen la característica de sintetizar insulina y liberarla al torrente sanguíneo en respuesta a un incremento de la glucemia. El mecanismo molecular por el cual la glucosa libera insulina por las células  $\beta$  involucra la participación de un transportador de glucosa, de tal forma que el incremento de la glucemia permite la entrada de la glucosa a favor de su gradiente químico. La glucosa dentro de la célula  $\beta$  es rápidamente fosforilada y metabolizada por la glicólisis y el ciclo de Krebs en la mitocondria hasta la producción de ATP. El concomitante incremento del ATP produce una reducción de la concentración de ADP y esto resulta en el cierre de los canales de potasio sensibles al ATP, este cierre conduce a la despolarización de la MP y la activación de los CCDV que se encuentran cerca de los gránulos de secreción que contienen la insulina. Este incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en la vecindad de los gránulos de secreción es detectado por la maquinaria exocítica, el receptor de Ca de tipo C2 synaptotagmin-1 y el complejo SNARE (formado por las proteínas VAPM2, Syntaxin1A/4 y SNAP23/25). Este evento es responsable de la liberación inicial de insulina, pero se ha demostrado que la liberación de insulina es bifásica, la segunda fase de secreción de insulina requiere la participación del MCU, la entrada de  $Ca^{2+}$  a la matriz mitocondrial sostiene la producción de ATP y esto permite una segunda fase de la liberación de insulina. Adicionalmente, la liberación de insulina es oscilatoria, y en este proceso se involucra la activación del canal BKCa. El exceso de  $Ca^{2+}$  que entra por el CCDV, se incorpora al RE y existe un mecanismo de liberación de  $Ca^{2+}$  que pareciera involucrar al RyR, y esto activa a los canales BKCa y se hiperpolarizan las células  $\beta$ , esto cierra los CCDV, se reduce la cantidad de  $Ca^{2+}$  luminal y se desactivan los canales BKCa y si la glucosa sigue elevada, se reinicia el proceso de entrada de  $Ca^{2+}$  por los CCDV y la subsecuente liberación de insulina [73,74].

## 5.3. Glucogenólisis en el hígado

La glucogenólisis es un proceso catabólico que se lleva a cabo en el citoplasma. La glucogenólisis ocurre de manera importante en el músculo y el hígado y es estimulada por las hormonas epinefrina (adrenalina) y glucagón, respectivamente [75]. En esta sección se describirán algunos conceptos únicamente de la glucogenólisis que se lleva a cabo dentro del hígado y la forma en la que el  $Ca^{2+}$  regula este proceso.

El hígado es un órgano que actúa como un reservorio de glucosa que le permite responder a estímulos e inducir procesos de

almacenamiento o liberación de glucosa en el torrente sanguíneo y así mantener la euglucemia. El hígado regula la homeostasis de la glucosa a través de procesos como el almacenamiento de glucógeno, la glucogenólisis y la gluconeogénesis, los cuales son regulados por diversas cascadas de señalización dependientes de oscilaciones de  $Ca^{2+}$  [76].

Cuando un organismo se encuentra en un estado de baja concentración de glucosa en sangre, es decir en un estado hipoglucémico, las células  $\alpha$  pancreáticas secretan glucagón. Esta hormona activa a la cinasa de la fosforilasa dependiente de cAMP y  $Ca^{2+}$ , la cual a su vez activa a la fosforilasa de glucógeno que hidroliza el glucógeno en glucosa-1-fosfato. La producción de glucosa hepática constituye cerca del 90% de la producción total de glucosa endógena [74].

Un modelo que trata de explicar cómo se realiza la secreción del glucagón, propone que cuando un organismo presenta una baja concentración de glucosa en sangre, los canales de  $K^+$  dependientes de ATP se abrirán llevando el potencial de membrana aproximadamente a  $-60$  mV, el cual favorece que los CCDV tipo T se abran, despolarizando a las células. Esta reducción en el potencial de membrana activa a los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje y los CCDV tipo N. La entrada de  $Ca^{2+}$  mediada por los canales tipo N induce la secreción de gránulos de glucagón [77].

La hidrólisis exagerada del glucógeno o dificultades para almacenar la glucosa en el glucógeno del hígado, derivan en patologías como diabetes tipo 2 (DM2), la enfermedad de Cori o la enfermedad de Pompe. A continuación, se realizará una breve descripción de estas enfermedades, donde se visualiza la relevancia de la homeostasis de glucosa.

La DM2 tiene una etiología de origen multifactorial en la que participan factores genéticos y ambientales, y se piensa que la principal causa es la resistencia a la insulina. La insulina es una hormona producida en el páncreas que tiene una acción antagónica a la del glucagón, teniendo como función que la glucosa sea incorporada dentro de las células a través de los receptores de membrana GLUT-4. En el estado de resistencia a insulina, la glucosa no puede ser incorporada dentro de las células, produciendo hiperglucemia, es decir un nivel elevado de glucosa en sangre, lo que provoca daños en diferentes órganos, así como todas las complicaciones asociadas a esta afección [77].

La enfermedad de Cori-Forbes es una afección autosómica recesiva que provoca una deficiencia de la enzima desramificadora de glucógeno (amiló-1,6-glucosidasa). Las personas afectadas producen moléculas de glucógeno con estructuras anormales que presentan cadenas externas cortas que no pueden continuar degradándose, por lo que el glucógeno se continúa acumulando en el hígado y el músculo cardíaco y esquelético, provocando síntomas de hipoglucemia, daño en el funcionamiento del hígado o los músculos y en algunas ocasiones los pacientes pueden desarrollar cardiomiopatías [78].

La enfermedad de Pompe o enfermedad del almacenamiento de glucógeno tipo II es un trastorno autosómico recesivo, en el cual la enzima glucosil transferasa  $\alpha(1\rightarrow4)$  ácida lisosómica (GAA, por sus siglas en inglés), encargada de hidrolizar el glucógeno en glucosa dentro de los lisosomas sufre alguna mutación que le impide realizar correctamente su función, se han descrito hasta aho-

ra más de 300 mutaciones en el gen GAA, las cuales determinan si hay una pérdida total o parcial de su actividad enzimática. Aunque puede afectar diferentes tejidos, son el músculo esquelético y cardíaco los más afectados, ya que en ellos se produce mucho glucógeno residual que es captado por los lisosomas para su ruptura en glucosa. El glucógeno es almacenado hasta que rompe los lisosomas y perturba la correcta función celular [79].

#### 5.4. Fecundación

La fecundación es un proceso en el cual se requiere la interacción entre gametos femeninos y masculinos, maduros y competentes, para que estos se fusionen y formen un nuevo individuo. Diversos estudios han mostrado que los flujos de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{K}^+$  son importantes para establecer una interacción molecular entre el espermatozoide, su medio ambiente y el ovocito secundario. La célula germinal masculina se produce en la gónada (testículo) mediante un proceso de división de células germinales o espermatogonias denominado “espermatogénesis”, el cual, está regulado hormonalmente por el eje hipófisis-hipotálamo-gónada [80]. A partir de cada espermatogonia se producen cuatro espermatozoides haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos y a la vez están en comunicación con la célula nutricia o de Sertolli; estas últimas, a partir de moléculas señalizadoras, se encargan de inducir el proceso denominado “espermioogénesis” que convierte a las espermátides en espermatozoides, durante esta transformación se reconocen cuatro fases características: la fase de Golgi, la fase de capuchón, la fase acrosomal y la fase de maduración [81].

En la fase de Golgi, el AG se acerca al núcleo y desprende vesículas que se fusionan para convertirse en la vesícula acrosomal que se localiza en la fase apical del núcleo. En la fase de capuchón, la vesícula acrosomal se aplana formando una capucha sobre el núcleo, éste se compacta cambiando las histonas por protaminas dejando al gameto en un arresto del ciclo celular evitando la replicación y la transcripción (arresto en fase G0 del ciclo celular), volviendo así al gameto dependiente de modificaciones postranscripcionales como la fosforilación de proteínas las cuales ocurren en este tipo de células principalmente en residuos de tirosina. En la fase acrosomal, la espermátide gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal; se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza en la unión núcleo-axonema, las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la “pieza media” dando la morfología definitiva al espermatozoide. Finalmente, en la fase de maduración se forma la cabeza característica de cada especie (oval y plana) cubierta por el acrosoma, y la cola compuesta por la pieza media donde se encuentran las mitocondrias en forma de hélice, la pieza principal y la pieza terminal. El proceso de maduración termina con la liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero y mediante movimientos peristálticos los espermias se transportan a los ductos eferentes y de allí al epidídimo donde se almacenan para posteriormente ser expulsados junto con el plasma seminal durante la eyaculación [80].

El espermatozoide adquiere la capacidad de motilidad del flagelo en su tránsito por el epidídimo, el movimiento es carac-

terístico y consiste en un bateo simétrico de la cola que permite al espermatozoide desplazarse de forma progresiva, pero este movimiento comienza después de la eyaculación. Este proceso es conocido como la “activación del esperma”. Son dos los procesos fundamentales en la fecundación del óvulo por el espermatozoide, estos son: la capacitación del espermatozoide y la reacción acrosomal [81].

Al realizarse la eyaculación, los espermatozoides pasan rápidamente a través del útero y llegan a la unión útero-tubal. Posteriormente, pasan a lo que se conoce como el reservorio del oviducto (istmo) que es caracterizado por cilios luminales epiteliales y plegamientos de la mucosa que forman criptas, en éstas los espermatozoides pierden factores como mucopolisacáridos y proteínas dando comienzo al proceso conocido como capacitación del espermatozoide [80, 81].

La capacitación del espermatozoide es un proceso complejo, regulado por: la pérdida de colesterol de la membrana del espermatozoide, por la  $[\text{HCO}_3^-]$  y por la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Tiene como objetivo el convertir al espermatozoide en una célula capaz de realizar una interacción específica con el ovocito, para esta interacción el espermatozoide debe obtener un patrón de movimiento distinto el cual se caracteriza por movimientos de la cola del espermatozoide que semejan latigazos pronunciados, este patrón de movilidad se alcanza al llegar al estado de “hiperactivación del espermatozoide”. Este proceso se encuentra estrechamente relacionado con modificaciones en la distribución proteica en la membrana del espermatozoide, con alteraciones de las características de la membrana plasmática, con cambios en la actividad de enzimas y con la fosforilación de varias proteínas en los residuos de tirosina, pues la inhibición de la actividad de cinasa de tirosina inhibe la penetración al ovocito secundario, la reacción acrosomal y bloquea la fecundación [82, 83].

El proceso de capacitación del espermatozoide inicia cuando se encuentra en las criptas del istmo de las trompas uterinas. En esta ubicación, la membrana del espermatozoide sufre una pérdida de colesterol que causa un incremento de la  $[\text{HCO}_3^-]$ , mediante el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  presente en la MP plasmática del espermatozoide y un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  regulando la actividad del adenilato ciclasa (AC) y el metabolismo del cAMP, siendo esta regulación necesaria para la fosforilación de residuos de tirosina por la proteína PKA durante el proceso de capacitación [80]. El proceso termina una vez alcanzado el estado de hiperactivación del espermatozoide obteniendo el patrón de movimiento característico [82].

La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de los espermatozoides está regulada por una AT-Pasa de  $\text{Ca}^{2+}$  (la cual, actúa como una bomba de extrusión), por un intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  y por un NCX (los cuales introducen  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma), así mismo se encuentran depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como el acrosoma y las mitocondrias. Se ha reportado que el  $\text{Ca}^{2+}$  es transportado al acrosoma por una bomba dependiente de ATP sensible a tapsigargina y que se libera por medio de  $\text{IP}_3\text{R}$  presentes en la membrana del acrosoma [80, 81].

Una vez realizada la capacitación del espermatozoide, este gameto es capaz de llevar a cabo la “reacción acrosomal”, la cual es un proceso exocítico en respuesta a estímulos fisiológicos como la presencia de la glucoproteína ZP3 (proteína que se secreta de

la zona pelúcida del ovocito) y progesterona. En este proceso, se realizan múltiples fusiones de la membrana acrosomal del espermatozoide con la MP del mismo permitiendo la liberación de enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa y la acrosina, las cuales tienen como objetivo el permitir al espermatozoide penetrar la zona pelúcida del óvulo dando lugar a la fecundación [82].

La glucoproteína ZP3 activa al receptor de ZP3 presente en la MP del espermatozoide, un receptor con actividad de cinasa de tirosina que se autofosforila, este receptor también está involucrado en la transactivación de proteínas G que activan a proteínas como PLC y AC las cuales incrementan la cantidad de segundos mensajeros como el cAMP, el  $IP_3$  y el DAG. El incremento de estos segundos mensajeros tiene como consecuencia la activación de proteínas como PKA y PKC, así como liberación de  $Ca^{2+}$  del depósito acrosomal. Sin embargo, la principal causa del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a ZP3 requiere la presencia de  $Ca^{2+}$  en el medio extracelular pues involucra la activación de canales dependientes de depósito (posiblemente tras la activación de  $IP_3R$  presentes en la membrana acrosomal), CCDV y los intercambiadores NCX y  $Ca^{2+}/H^+$  los cuales modifican el pH y permiten un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  lento y sostenido [82, 83].

Una vez que el espermatozoide penetra la zona pelúcida del óvulo y alcanza el espacio perivitelino, suceden dos mecanismos para evitar la poliespermia (fecundación por más de un espermatozoide), uno inmediato, el cual es el cambio de potencial de membrana del ovocito que a su vez altera la polaridad de la zona pelúcida y el cambio subsiguiente involucra la remodelación de la zona pelúcida del ovocito, esta ocurre por la exocitosis del contenido enzimático de los gránulos corticales al espacio perivitelino y está regulada por PKC dependiente de factores lipídicos e independiente del  $Ca^{2+}$  [81, 82].

Durante los últimos años se ha conseguido un gran progreso en el entendimiento de los mecanismos moleculares del gameto masculino y su tránsito desde la gónada hasta la fertilización del ovocito. Sin embargo, es clara la presencia de vacíos en la información existente, lo cual permitirá a nuevos investigadores el diseño de experimentos para dilucidar los mecanismos moleculares y como el  $Ca^{2+}$  está involucrado en estos procesos.

### 5.5. Visión

La retina del ojo es capaz de detectar fotones a través de la activación de las rodopsinas. Éstas son proteínas de la MP de siete pasas transmembranales que están acopladas a las proteínas G. La proteína G involucrada pertenece a la familia  $G_{i/o}$  y la subunidad  $\alpha$  de esta proteína activa una fosfodiesterasa de GMPC, por lo tanto, la incidencia de los fotones en la retina promueve la hidrólisis del GMPC. En la MP se expresa un canal iónico, no selectivo permeable al  $Ca^{2+}$ , que se activa por el GMPC (CNGC, *cyclic nucleotide gated channel*, por sus siglas en inglés). Este canal está abierto en la oscuridad, debido a la abundancia del GMPC y ante la presencia de fotones, se reduce su actividad, lo que conlleva a la hiperpolarización celular y la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Aunque los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  no tienen un papel directo en la señalización por los fotones, sí tiene un papel importante en modular la sensibilidad a la luz. Esto debido a la presencia de una proteína que tiene cuatro

dominios de unión de  $Ca^{2+}$  o también conocidos como manos EF, la unión de  $Ca^{2+}$  a esta proteína, implica que el canal CNGC está abierto y por lo tanto hay poca luz, el complejo de  $Ca^{2+}$ -recoverina inhibe a la cinasa de la rodopsina, por lo que esta cinasa no puede llevar a cabo la desensibilización de la rodopsina por fosforilar su C-terminal. El resultado final de una  $[Ca^{2+}]_i$  elevada es el incremento del número de rodopsinas disponibles y por lo tanto un incremento en la sensibilidad a los fotones. Por otro lado, en las células de la retina se expresa una proteína capaz de activar a la guanilil ciclasa de la retina (*guanylyl cyclase activating protein*, GCAP, por sus siglas en inglés), esta proteína también tiene la capacidad de unir  $Ca^{2+}$  pero en esta condición no puede activar a la guanilil ciclasa, por lo tanto, un número bajo de fotones promueve la inhibición de la guanilil ciclasa lo que eventualmente termina inhibiendo la actividad de los canales CNGC. En resumen, el  $Ca^{2+}$  por un lado aumenta la actividad de la rodopsina por impedir que su cinasa los desensibilice y por otro lado limita la sensibilidad a la luz por reducir la producción de GMPC y por lo tanto la actividad del canal CNGC. Toda vez que se pasa de un ambiente muy oscuro a uno muy iluminado, se activa el exceso de rodopsinas, promoviendo la degradación del GMPC y por lo tanto la desactivación del canal CNGC, lo que reduce la  $[Ca^{2+}]_i$ , eso hace que la proteína GCAP pierda el  $Ca^{2+}$  unido y se active a la guanilil ciclasa y por lo tanto se contenga la inhibición del canal CNGC. Este panorama indica que, aunque el  $Ca^{2+}$  no está directamente involucrado en la señalización por los fotones, sí está involucrado en la fotosensibilidad por modular la actividad de la guanilil ciclasa y la actividad de la cinasa de la rodopsina. Es interesante que ambas acciones van en sentidos opuestos, de tal forma que es un ejemplo de cómo el papel del ion  $Ca^{2+}$  como segundo mensajero es muy complejo pues involucra la actividad concertada de una batería amplia de proteínas [84].

### 5.6. Apoptosis

El  $Ca^{2+}$  al interior de la mitocondria es crucial para regular la respiración mitocondrial, específicamente al estimular la actividad de tres deshidrogenasas pertenecientes al ciclo de Krebs [56]. Sin embargo, la acumulación excesiva de  $Ca^{2+}$  conduce a un proceso de muerte celular conocido como apoptosis. La apoptosis o también llamada muerte celular programada es un mecanismo molecular que se caracteriza por cambios estructurales como vesiculación de la MP, fragmentación del DNA, condensación de la cromatina y la eliminación de fragmentos de la célula, todo esto con la finalidad de eliminar un daño celular existente [85]. Actualmente se consideran dos principales vías para la activación de la apoptosis, la vía extrínseca y la vía intrínseca; la primera involucra la participación de receptores en la MP, mientras que la segunda se activa por la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), la liberación de factores pro-apoptóticos, la activación de caspasas y finalmente la aparición de la apoptosis [55]. El mPTP es un poro no selectivo localizado en la membrana interna mitocondrial que se abre en respuesta a concentraciones elevadas de  $Ca^{2+}$  en la matriz mitocondrial [85]. Preferentemente se ha asociado la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  en la matriz con la transferencia de  $Ca^{2+}$  del RE a la mitocondria vía el  $IP_3R$  [55]. De hecho,

en células de ovario de hámster se observó que la isoforma 3 del  $IP_3R$  es la encargada de transferir la mayor cantidad de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria, misma que dispara el proceso apoptótico [86]. Por otra parte, modificaciones postraduccionales del  $IP_3R$  pueden modificar su actividad y con ello modular la cantidad de  $Ca^{2+}$  liberado. Por ejemplo, el  $IP_3R$  tipo 3 es inactivado mediante la fosforilación por Akt, lo cual reduce la transferencia de  $Ca^{2+}$  hacia la mitocondria, evitando la acumulación excesiva y que a la postre protege de la muerte celular por apoptosis [87].

A pesar de que la señal apoptótica dependiente de  $Ca^{2+}$  requiere de la actividad del  $IP_3R$ , se ha observado que las proteínas de la familia Bcl-2 también desempeñan un papel importante en la regulación de la muerte celular al modular la homeostasis de  $Ca^{2+}$  intracelular. Especialmente, la proteína anti-apoptótica Bcl-2 suprime la liberación de  $Ca^{2+}$  del RE, pues células B de linfoma con alta expresión de Bcl-2 mostraron menor liberación de  $Ca^{2+}$  del RE y protección a la apoptosis [88]. Aunque se desconoce con exactitud cómo es que Bcl-2 disminuye el flujo de  $Ca^{2+}$  del RE, se han sugerido dos mecanismos principalmente: 1) Bcl-2 disminuye el contenido de  $Ca^{2+}$  del RE al incrementar la fuga de  $Ca^{2+}$  o 2) Bcl-2 disminuye la salida de  $Ca^{2+}$  del RE sin modificar el contenido del depósito. Con respecto al primer mecanismo, se tiene evidencia que Bcl-2 regula la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  pues la sobreexpresión de esta proteína produjo un incremento en la fuga de  $Ca^{2+}$  así como en la disminución del contenido de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  [89, 90]. Esto es importante pues bajo estas condiciones el flujo de  $Ca^{2+}$  liberado por la acción de agonistas se redujo considerablemente y con ello una cantidad de  $Ca^{2+}$  limitada para ser capturado por las mitocondrias, evitando la sobrecarga con este ion y así evadir la señal de  $Ca^{2+}$  iniciadora de la apoptosis [90]. A pesar de que Bcl-2 puede formar un canal iónico, mutaciones en la estructura del poro no alteraron la fuga de  $Ca^{2+}$  del RE [91], sugiriendo que Bcl-2 disminuye el flujo de  $Ca^{2+}$  al modificar la actividad de proteínas como el  $IP_3R$ . De hecho, se ha visto que Bcl-2 interactúa con el  $IP_3R$  y esta unión inhibe tanto la liberación de  $Ca^{2+}$  del RE como la apoptosis [88]. Por el contrario, al utilizar péptidos sintéticos que bloquean esta interacción se observó un incremento en la muerte celular [92].

Por otra parte, Bax y Bak, proteínas de la familia Bcl-2 con actividad pro-apoptótica desempeñan un rol opuesto a Bcl-2, pues la ausencia de estas proteínas condujo a una disminución en los niveles de  $Ca^{2+}$  en el RE y una limitada captura de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria. Contrario a esto, la señal apoptótica se restableció cuando se restauró la expresión de estas proteínas [93]. Estos hallazgos sugieren que a diferencia de Bcl-2, Bax y Bak disminuyen la fuga de  $Ca^{2+}$  del RE, incrementando la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  y por lo tanto acumulando cantidades mayores de  $Ca^{2+}$  para ser transferidas a la mitocondria. Además, un estudio reciente demostró que Bok, otra proteína pro-apoptótica, promueve la apoptosis al facilitar la transferencia de  $Ca^{2+}$  del RE a la mitocondria. Se sugiere que Bok interactúa con el  $IP_3R$  en los sitios de contacto entre estos dos organelos, manteniendo estable la interacción [94]. Todos estos estudios muestran un papel importante del ion  $Ca^{2+}$  como centro de control para el inicio de la muerte celular programada o apoptosis.

## 5.7. Estrés del RE, obesidad y resistencia a la insulina

Las concentraciones de  $Ca^{2+}$  al interior del RE son considerablemente mayores con respecto a aquellas presentes en el citoplasma. Para que el RE mantenga una  $[Ca^{2+}]_{RE}$  elevada, diversas proteínas funcionan como esponjas que unen  $Ca^{2+}$ , incrementando así la capacidad del RE para almacenar este ion y, por lo tanto, un ambiente con elevadas  $[Ca^{2+}]$ . Esto es importante para el procesamiento de proteínas, pues los niveles altos de  $Ca^{2+}$  al interior del RE regulan alostéricamente proteínas conocidas como chaperonas que desempeñan un rol importante en la estabilización y plegamiento de las proteínas recién sintetizadas en el RE [95]. Dentro de las chaperonas mejor descritas se encuentran calreticulina, GRP94, BiP/GRP78, ERp44, entre otras. Cuando se reducen los niveles de  $Ca^{2+}$  en el RE, se produce una acumulación excesiva de proteínas mal plegadas, disparando un proceso conocido como estrés del RE. Ante esto, las células por medio del mecanismo UPR aligeran el estrés generado con la finalidad de asegurar la supervivencia. Este mecanismo se encarga de disminuir la cantidad de proteínas mal plegadas, lo cual se logra al: 1) incrementar la expresión de chaperonas, 2) dirigir el remanente de proteínas mal plegadas a procesos de degradación y 3) mantener las altas  $[Ca^{2+}]_{RE}$  [96]. Respecto a este último punto, las chaperonas desempeñan un papel importante para evitar un completo agotamiento de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ . Por ejemplo, se ha mostrado que chaperonas como BiP/GRP78 y ERp44 son capaces de regular al  $IP_3R$  por un mecanismo que involucra la interacción alternada de estas proteínas con el receptor, disminuyendo de esta forma la liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $IP_3$ . Además, BiP contribuye a prevenir la fuga de  $Ca^{2+}$  al interactuar con el translocón, mismo que se ha sugerido que participa en el estrés del RE mediante su actividad como canal de fuga, pues la fuga de  $Ca^{2+}$  así como el estrés generado por vaciamiento de  $Ca^{2+}$  del RE se inhibió al utilizar anisomicina, un inhibidor del translocón. Por otra parte, la expresión de BiP aumentó cuando se abrió el poro del canal, y fue suprimida por anisomicina, demostrando que el translocón desempeña un papel importante para inducir estrés del RE [95,97].

A nivel funcional, estas alteraciones en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  pueden afectar diversos tejidos, entre ellos músculo esquelético, hígado o páncreas, que en conjunto convergen en alteraciones metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina, diabetes, entre otras [98, 99]. Por ejemplo, se ha observado que la activación prolongada del estrés del RE tiene un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes [100]. Con relación a esto, se observó que el RE en hígado de ratones obesos presentaba una supresión en la síntesis de proteínas, pero un incremento en la síntesis de lípidos. Este incremento en el contenido de lípidos modificó la composición de la membrana del RE, misma que inhibió la actividad de la bomba SERCA, conduciendo a una disminución en los niveles de  $Ca^{2+}$  luminal, estrés del RE y desarrollo de obesidad [98, 101]. De hecho, se ha observado que la exposición a ácidos grasos saturados como el ácido palmítico reducen la expresión de la bomba SERCA, conduciendo a estrés del RE y al estado de resistencia a la insulina [102]. Además del contenido de lípidos, otras condiciones como estrés oxidativo o inflamación están relacionadas con una disminución

en la actividad de la bomba SERCA y alteraciones en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal que en conjunto conducen a estrés del RE y estados como diabetes o resistencia a la insulina [37, 103]

Adicional a las alteraciones en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ , incrementos en los niveles de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{p}}$ , así como el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la mitocondria parece jugar un papel importante en el desarrollo de alteraciones metabólicas. Se ha reportado que incrementos en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico activan factores de transcripción que regulan de manera positiva la lipogénesis, dando como resultado una acumulación y almacenamiento de lípidos, mismos que son característicos de un estado de obesidad [98]. Por otra parte, se ha observado que un incremento en los sitios de contacto entre el RE y la mitocondria en hígado de ratones obesos disparan una mayor movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la mitocondria. Esta sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial condujo a estrés oxidativo y un deterioro en la homeostasis de glucosa [104]. De hecho, un estudio reciente demostró que el RE y las mitocondrias sufren una desorganización estructural en el hígado de ratones con obesidad [105]. Además, en tejido adiposo de ratones con obesidad se mostró que tanto la expresión como la actividad del  $\text{IP}_3\text{R}$  se encuentran incrementadas, y que cuando se elimina la expresión del  $\text{IP}_3\text{R}$ , los ratones son resistentes a desarrollar resistencia a la insulina, incluso cuando existe una dieta rica en ácidos grasos [106]. Sin embargo, no está del todo claro cómo es que la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el  $\text{IP}_3\text{R}$  y los sitios de contacto entre el RE y la mitocondria regulan el metabolismo de la glucosa, pues otros datos han mostrado que la pérdida en la interacción entre estos dos organelos promueve al desarrollo de resistencia a la insulina, esto al disminuir la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE hacia la mitocondria [107]. A pesar de que existen diferentes mecanismos para desencadenar el desarrollo de trastornos metabólicos, todos estos convergen en que el  $\text{Ca}^{2+}$  desempeña un papel crítico para mantener el correcto funcionamiento celular.

## 6. Conclusión

Incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  afecta la función celular y así tenemos que cambios transitorios de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  tiene un papel importante en fenómenos como la contracción muscular para movernos, el bombeo de la sangre, la digestión, la micción, la secreción de glándulas exocrinas y endocrinas, la neurotransmisión, la respiración mitocondrial, el metabolismo, la expresión de genes, entre otros eventos. Incrementos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  que son excesivos o prolongados resultan en condiciones tóxicas para las mitocondrias y letales para las células. Esto implica que el uso continuo del ion  $\text{Ca}^{2+}$  termina cobrando una factura ya sea degenerativa o francamente letal para el organismo. Las proteínas involucradas en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  están bien identificadas, sin embargo, aún faltan por determinar la dinámica de muchos eventos, particularmente con resoluciones adecuadas tanto espaciales (nanómetros) como temporales (milisegundos) que nos permitirán entender y regular los mecanismos bioquímicos que subyace a la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  como regulador de una lista tan variada y compleja de fenómenos celulares.

## Referencias

- [1] Clapham, D. E., Calcium Signaling. *Cell* 2007; 131:1047–1058.
- [2] Carafoli, E., y Krebs, J., Why calcium? How calcium became the best communicator. *J Biol Chem* 2016; 291:20849–20857.
- [3] Ambudkar, I. S., Hofer, A. M., Editorial overview: Calcium signaling. *Curr Opin Physiol* 2020; 17:iii.
- [4] Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, Y. T., A New Generation of  $\text{Ca}^{2+}$  Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *J Biol Chem* 1985; 260:3440–3450.
- [5] Russell, J. T., Imaging calcium signals *in vivo*: A powerful tool in physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* 2011; 163:1605–1625.
- [6] Pérez Koldenkova, V., Nagai, T., Genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators: Properties and evaluation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2013; 1833:1787–1797.
- [7] Catterall, W. A., Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:1–23.
- [8] Tien, J., Young, D. M., Jan, Y. N., Jan, L. Y., Molecular Properties of Ion Channels. Third Edit. *Elsevier Inc.* (2014). p. 323–348
- [9] Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., Hogan, P. G., Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 2006; 443:230–233.
- [10] Marchi, S., Pinton, P., The mitochondrial calcium uniporter complex: Molecular components, structure and physiopathological implications. *J Physiol* 2014; 592:829–839.
- [11] Wang, M., Sun, Y., Li, L., Wu, P., D. K. W., O, Shi, H., Calcium Channels: Noteworthy Regulators and Therapeutic Targets in Dermatological Diseases. *Front Pharmacol* 2021; 12:1–16.
- [12] Ottolia, M., Torres, N., Bridge, J. H. B., Philipson, K. D., Goldhaber, J. I., Na/Ca exchange and contraction of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 61:28–33.
- [13] Vandecaetsbeek, I., Vangheluwe P, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J. The  $\text{Ca}^{2+}$  Pumps of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:1–24.
- [14] Stafford, N., Wilson, C., Oceandy, D., Neyses, L., Cartwright, E. J., The plasma membrane calcium ATPases and their role as major new players in human disease. *Physiol Rev* 2017; 97:1089–1125.
- [15] Xu, H., Van Remmen, H., The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) pump: a potential target for intervention in aging and skeletal muscle pathologies. *Skelet Muscle* 2021; 11:1–9.
- [16] He, W., Hu, Z., The Role of the Golgi-Resident SPCA  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  Pump in Ionic Homeostasis and Neural Function. *Neurochem Res* 2012; 37:455–468.
- [17] Woll, K. A., Van Petegem, F., Calcium-release channels: Structure and function of  $\text{IP}_3$  receptors and ryanodine receptors. *Physiol Rev* 2022; 102:209–268.
- [18] Taylor, C. W., Tovey, S. C.,  $\text{IP}_3$  Receptors: Toward Understanding Their Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:1–23.
- [19] Berridge, M. J., The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol Rev* 2016; 96:1261–1296.
- [20] Fill, M., Copello, J. A., Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol Rev* 2002; 82:159–182.

- [21] Schwarz, D. S., Blower, M. D., The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73:79–94.
- [22] Sozen, E., Ozer, N. K., Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review. *Redox Biol* 2017; 12:456–461.
- [23] Stefan, C. J., Endoplasmic reticulum–plasma membrane contacts: Principals of phosphoinositide and calcium signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2020; 63:125–134.
- [24] Prins, D., Michalak, M., Organellar Calcium Buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; a004069.
- [25] Dagan, I., Palty, R., Regulation of Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry by SARA. *Cells* 2021; 10:1887.
- [26] Oakes, S. A., Papa, F. R., The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2015; 10:173–194.
- [27] Bagchi, P. “Endoplasmic reticulum in viral infection.” International Review of Cell and Molecular Biology. Elsevier Inc. (2020). p. 265–284.
- [28] Farquhar, M. G., Palade, G. E., The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol* 1998; 8:2–10.
- [29] Liu, J., Huang, Y., Li, T., Jiang, Z., Zeng, L., Hu, Z., The role of the Golgi apparatus in disease (Review). *Int J Mol Med* 2021; 47:
- [30] Makhoul, C., Gosavi, P., Gleeson, P. A., Golgi Dynamics: The Morphology of the Mammalian Golgi Apparatus in Health and Disease. *Front Cell Dev Biol* 2019; 7:1–7.
- [31] Li, J., Wang, Y., Golgi Metal Ion Homeostasis in Human Health and Diseases. *Cells* 2022; 11:1–16.
- [32] Pinton, P., Pozzan, T., Rizzuto, R., The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 1998; 17:5298–5308.
- [33] Aulestia, F. J., Alonso, M. T., García-Sancho, J., Differential calcium handling by the cis and trans regions of the Golgi apparatus. *Biochem J* 2015; 466:455–465.
- [34] Lissandron, V., Podini, P., Pizzo, P., Pozzan, T., Unique characteristics of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis of the trans-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:9198–9203.
- [35] Wong, A. K. C., Capitanio, P., Lissandron, V., Bortolozzi, M., Pozzan, T., Pizzo, P., Heterogeneity of  $\text{Ca}^{2+}$  handling among and within Golgi compartments. *J Mol Cell Biol* 2013; 5:266–276.
- [36] Pizzo, P., Lissandron, V., Capitanio, P., Pozzan, T.,  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium* 2011; 50:184–192.
- [37] Gallegos-Gómez, M-L., Greotti, E., López-Méndez, M-C., Sánchez-Vázquez, V-H., Arias, J-M., Guerrero-Hernández, A., The Trans Golgi Region is a Labile Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Store Sensitive to Emetine. *Sci Rep* 2018; 8:17143.
- [38] Gao, J., Chen, L., Cell Biology The role of metal ions in the Golgi apparatus. 2022; 1309–1319.
- [39] Pakdel, M., Von Blume, J., Exploring new routes for secretory protein export from the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* 2018; 29:235–240.
- [40] Ballabio, A., Bonifacino, J. S., Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21:101–118.
- [41] Luzio, J. P., Hackmann, Y., Dieckmann, N. M. G., Griffiths, G. M., Lysosome-Related Organelles. 2014; 1–17.
- [42] Wu, Y., Huang, P., Dong, X. P., Lysosomal calcium channels in autophagy and cancer. *Cancers (Basel)* 2021; 13:1–18.
- [43] Lloyd-Evans, E., Waller-Evans, H., Lysosomal  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and signaling in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2020; 12:1–20.
- [44] Melchionda, M., Pittman, J. K., Mayor, R., Patel, S.,  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchange by acidic organelles regulates cell migration *in vivo*. *J Cell Biol* 2016; 212:803–813.
- [45] Garrity, A. G., Wang, W., Collier, C. M. D., Levey, S. A., Gao, Q., Xu, H., The endoplasmic reticulum, not the pH gradient, drives calcium refilling of lysosomes. *Elife* 2016; 5:
- [46] Peng, W., Wong, Y. C., Krainc, D., Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics via lysosomal TRPML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117:19266–19275.
- [47] Feng, X., Xiong, J., Lu, Y., Xia, X., Zhu, M. X., Differential mechanisms of action of the mucolipin synthetic agonist, ML-SA1, on insect TRPML and mammalian TRPML1. *Cell Calcium* 2014; 56:446–456.
- [48] Di Paola, S., Scotto-Rosato, A., Medina, D. L., TRPML1: The  $\text{Ca}^{2+}$  retaker of the lysosome. *Cell Calcium* 2018; 69:112–121.
- [49] Burgoyne, R. D., Morgan, A., Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003; 83:581–632.
- [50] Miklavc, P., Frick, M., Vesicular calcium channels as regulators of the exocytotic post-fusion phase. *Commun Integr Biol* 2011; 4:796–798.
- [51] Petersen, O. H., Calcium signalling and secretory epithelia. *Cell Calcium* 2014; 55:282–289.
- [52] Álvarez, J., Calcium dynamics in the secretory granules of neuroendocrine cells. *Cell Calcium* 2012; 51:331–337.
- [53] Carafoli, E., The interplay of mitochondria with calcium: An historical appraisal. *Cell Calcium* 2012; 52:1–8.
- [54] Somlyo, A. P., Bond, M., Somlyo, A. V., Calcium content of mitochondria and endoplasmic reticulum in liver frozen rapidly *in vivo*. *Nature* 1985; 314:622–625.
- [55] Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., Mammucari, C., Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13:566–578.
- [56] Pallafacchina, G., Zanin, S., Rizzuto, R., From the identification to the dissection of the physiological role of the mitochondrial calcium uniporter: An ongoing story. *Biomolecules* 2021; 11:
- [57] Feno, S., Rizzuto, R., Raffaello, A., Vecellio Reane, D., The molecular complexity of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Cell Calcium* 2021; 93:
- [58] Liu, J. C., Liu, J., Holmstrom, K. M., Menazza, S., Parks, R. J., Fergusson, M. M., Yu, Z. X., Springer, D. A., Halsey, C., Liu, C., *et al.* MICU1 Serves as a Molecular Gatekeeper to Prevent *In Vivo* Mitochondrial Calcium Overload. *Cell Rep* 2016; 16:1561–1573.
- [59] Finkel, T., Menazza, S., Holmström, K. M., Parks, R. J., Liu, J., Sun, J., Liu, J., Pan, X., Murphy, E., The ins and outs of mitochondrial calcium. *Circ Res* 2015; 116:1810–1819.
- [60] Guerrero-Hernandez, A., Dagnino-Acosta, A., Verkhatsky, A., An intelligent sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  store: Release and leak channels have differential access to a concealed  $\text{Ca}^{2+}$  pool. *Cell Calcium* 2010; 48:143–149.
- [61] Smith, G. L., Eisner, D. A., Calcium Buffering in the Heart in Health and Disease. *Circulation* 2019; 139:2358–2371.

- [62] Elíes, J., Yáñez, M., Pereira, T. M. C., Gil-Longo, J., Macdougal, D. A., Campos-Toimil, M., "An Update to Calcium Binding Proteins." *Calcium Signaling*. (2020). p. 183–213.
- [63] Nalefski, E. A., Falke, J. J., The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Sci* 1996; 5:2375–2390.
- [64] Rizo, J., Südhof, T. C., C2-domains, Structure and Function of a Universal Ca<sup>2+</sup>-binding Domain. *J Biol Chem* 1998; 273:15879–15882.
- [65] Gifford, J. L., Walsh, M. P., Vogel, HJ. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* 2007; 405:199–221.
- [66] Kawasaki, H., Kretsinger, R. H., Structural and functional diversity of EF-hand proteins: Evolutionary perspectives. *Protein Sci* 2017; 26:1898–1920.
- [67] Benchoula, K., Mediani, A., Hwa, W. E., The functions of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in diabetes progression. *J Cell Commun Signal* 2022.
- [68] Enomoto, M., Nishikawa, T., Back, S. I., Ishiyama, N., Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Ikura, M., Coordination of a Single Calcium Ion in the EF-hand Maintains the Off State of the Stromal Interaction Molecule Luminal Domain. *J Mol Biol* 2020; 432:367–383.
- [69] Luan, S., Wang, C., Calcium Signaling Mechanisms across Kingdoms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2021; 37:311–340.
- [70] Park, H. S., Lee, S. C., Cardenas, M. E., Heitman, J., Calcium-Calmodulin-Calcineurin Signaling: A Globally Conserved Virulence Cascade in Eukaryotic Microbial Pathogens. *Cell Host Microbe*, 2019; 26:453–462.
- [71] W SHL and HD. Muscle contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10:1–13.
- [72] Hill, M. A., Yang, Y., Ella, S. R., Davis, M. J., Braun, A. P., Large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling. *FEBS Lett* 2010; 584:2033–2042.
- [73] Anantharam, A., Kreutzberger, A. J. B., Unraveling the mechanisms of calcium-dependent secretion. *J Gen Physiol*, 2019; 151:417–434.
- [74] Petersen, M. C., Vatner, D. F., Shulman, G. I., Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 2017; 13:572–587.
- [75] Rui, L., Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 2014; 4:177–197.
- [76] Bartlett, P. J., Gaspers, L. D., Pierobon, N., Thomas, A. P., Calcium-dependent regulation of glucose homeostasis in the liver. *Cell Calcium* 2014; 55:306–316.
- [77] Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C., Nadal, Á., Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 2008; 199:5–19.
- [78] Anwar, S., Rahaman, A. M., Matin, A., Saha, D., Rashid, M., Glycogen Storage Disease Type III-Cori's Disease: A Case Report and Review Literature. *Bangladesh J Child Heal* 2015; 39:161–163.
- [79] Stevens, D., Milani-Nejad, S., Mozaffar, T., Pompe Disease: a Clinical, Diagnostic, and Therapeutic Overview. *Curr Treat Options Neurol*, 2022.
- [80] Olivera, M., Agr, S., Ruiz, T., Tarazona, A., Giraldo, C., El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Colomb Ciencias Pecu* 2006; 19:426–436.
- [81] Darío, W., Maya, C., Olivera, M., Patricia, Á., Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide. *Andrologia* 2006; 5:501–510.
- [82] Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Muratori, M., Forti, G., Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci*, 2000; 5:d110.
- [83] Breitbart, H., Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2003; 49:321–327.
- [84] Das, S., Chen, Y., Yan, J., Christensen, G., Belhadj, S., Tolone, A., Paquet-Durand, F., The role of cGMP-signalling and calcium-signalling in photoreceptor cell death: perspectives for therapy development. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2021; 473:1411–1421.
- [85] Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., Rizzuto, R., Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 2008; 27:6407–6418.
- [86] Mendes, C. C., Gomes, D. A., Thompson, M., Souto, N. C., Goes, T. S., Goes, A. M., Rodrigues, M. A., Gomez, M. V., Nathanson, M. H., Leite, M. F., The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca<sup>2+</sup> signals into mitochondria. *J Biol Chem* 2005; 280:40892–40900.
- [87] Marchi, S., Marinello, M., Bononi, A., Bonora, M., Giorgi, C., Rimessi, A., Pinton, P., Selective modulation of subtype III IP<sub>3</sub>R by Akt regulates ER Ca<sup>2+</sup> release and apoptosis. *Cell Death Dis* 2012; 3:1–10.
- [88] Vervliet, T., Parys, J. B., Bultynck, G., Bcl-2 proteins and calcium signaling: complexity beneath the surface. *Oncogene* 2016; 35:5079–5092.
- [89] Foyouzi-youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner, C., Kelley, W. L., Tschopp, J., Lew, D., Demaurex, N., Krause, K., Bcl-2 decreases the free Ca<sup>2+</sup> concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:5723–5728.
- [90] Pinton, P., Ferrari, D., Magalhães, P., Schulze-osthoff, K., Virgilio, F. Di., Pozzan, T., Rizzuto, R., Reduced Loading of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Stores and Downregulation of Capacitative Ca<sup>2+</sup> Influx In Bcl-2 Overexpressing Cells. *J Cell Biol*, 2000; 148:857–862.
- [91] Chami, M., Prandini, A., Campanella, M., Pinton, P., Szabakai, G., Reed, J. C., Rizzuto, R., Bcl-2 and Bax Exert Opposing Effects on Ca<sup>2+</sup> Signaling, Which Do Not Depend on Their Putative Pore-forming Region. *J Biol Chem*, 2004; 279:54581–54589.
- [92] Lavik, A. R., Zhong, F., Chang, M. J., Greenberg, E., Choudhary, Y., Smith, M. R., McColl, K. S., Pink, J., Reu, F. J., Matsuyama, S., *et al.* A synthetic peptide targeting the BH4 domain of Bcl-2 induces apoptosis in multiple myeloma and follicular lymphoma cells alone or in combination with agents targeting the BH3-binding pocket of Bcl-2. *Oncotarget* 2015; 6:27388–27402.
- [93] Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., Korsmeyer, S. J. BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>: A Control Point for Apoptosis. *Science* (80- ) 2003; 300:135–140.
- [94] Carpio, M. A., Means, R. E., Brill, A. L., Sainz, A., Ehrlich B. E., Katz, S. G. BOK controls apoptosis by Ca<sup>2+</sup> transfer through ER-mitochondrial contact sites. *Cell Rep* 2021; 34:108827.
- [95] Groenendyk, J., Agellon, L. B., Michalak, M., Calcium signaling and endoplasmic reticulum stress. 1st ed. Elsevier Inc. (2021). p. 1–20.

- [96] Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodríguez, A. E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z. V., Zorzano, A., Hill, J. A., Jaimovich, E., *et al.* Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. *Dynamics and Metabolic Integration*. (2013). p. 215–290.
- [97] Hammadi, M., Oulidi, A., Gackiere, F., Katsogiannou, M., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Dewailly, E., Delcourt, P., Lepage, G., Lotteau, S., *et al.*, Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: Involvement of GRP78. *FASEB J* 2013; 27:1600–1609.
- [98] Arruda, A. P., Hotamisligil, G. S., Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Cell Metab*, 2015; 22:381–397.
- [99] Guerrero-Hernandez, A., Verkhatsky, A., Calcium signaling in diabetes. *Cell Calcium*, 2014; 56:297–301.
- [100] Hotamisligil, G. S., Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*, 2010; 140:900–917.
- [101] Fu, S., Watkins, S. M., Hotamisligil, G. S., The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab* 2012; 15:623–634.
- [102] Gustavo Vazquez-Jimenez, J., Chavez-Reyes, J., Romero-Garcia, T., Zarain-Herzberg, A., Valdes-Flores, J., Manuel Galindo-Rosales, J., Rueda, A., Guerrero-Hernandez, A., Alber to Olivares-Reyes, J., Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. *Cell Signal* 2016; 28:53–59.
- [103] Guerrero-Hernández, A., Leon-Aparicio, D., Chavez-Reyes, J., Olivares-Reyes, J. A., De Jesus S., Endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *Cell Calcium* 2014; 56:311–322.
- [104] Arruda, A. P., Pers, B. M., Parlakgöl, G., Güney, E., Inouye, K., Hotamisligil, G. S., Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med* 2014; 20:1427–1435.
- [105] Parlakgöl, G., Arruda, A. P., Pang, S., Cagampan, E., Min, N., Güney, E., Lee, G. Y., Inouye, K., Hess, H. F., Xu, C. S., *et al.*, Regulation of liver subcellular architecture controls metabolic homeostasis. *Nature*, 2022; 603:736–742.
- [106] Güney, E., Arruda, A. P., Parlakgöl, G., Cagampan, E., Min, N., Lee, G. Y., Greene, L., Tsaousidou, E., Inouye, K., Han, M. S., *et al.* Aberrant Ca<sup>2+</sup> signaling by IP<sub>3</sub>Rs in adipocytes links inflammation to metabolic dysregulation in obesity. *Sci Signal*, 2021; 14:
- [107] Rieusset, J., Fauconnier, J., Paillard, M., Belaidi, E., Tubbs, E., Chauvin, M., Durand, A., Bravard, A., Teixeira, G., Bartosch, B., *et al.*, Disruption of calcium transfer from ER to mitochondria links alterations of mitochondria-associated ER membrane integrity to hepatic insulin resistance. *Diabetologia* 2016; 59:614–623.



El laboratorio 10 del departamento de Bioquímica del Cinvestav estudia los procesos bioquímicos asociados con la regulación del calcio intracelular. Diferentes señales físicas o químicas incrementan la concentración intracelular de calcio. Estas señales abren canales iónicos de la membrana plasmática o de diferentes depósitos intracelulares de calcio como son el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los lisosomas. La concentración intracelular de calcio incrementa de forma transitoria, de lo contrario, resulta en la muerte de la célula. La remoción de calcio del citoplasma involucra el consumo de energía en forma de ATP, siendo la mitocondria la fuente de dicho nucleótido. Esto implica una comunicación estrecha de la mitocondria con la membrana plasmática y el retículo endoplásmico. Modificaciones en esta comunicación resultan en la presencia de células cancerosas y el estado de resistencia a la insulina. Dilucidar dichas alteraciones nos permitirá proponer estrategias terapéuticas contra tales patologías.

# Dominios de membrana: plataformas de señalización celular

Ulises Meza\* y Aldo A. Rodríguez-Menchaca\*

Departamento de Fisiología y Biofísica. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Av. Venustiano Carranza #2405, Col. Los Filtros, San Luis Potosí, SLP, 78210, México

Tel. +52 444 8262344 ext. 6646/6649. Correo-e: umeza@uaslp.mx; aldo.rodriguez@uaslp.mx

**Resumen:** Las balsas de membrana constituyen nanodominios de naturaleza lipoproteica que propician la eficiente transducción de señales en la membrana plasmática. Su alteración se asocia con trastornos funcionales que pueden comprometer la supervivencia de las células y los organismos, lo que ha llevado a considerarlas potenciales blancos terapéuticos.

## Abreviaturas

cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico
ERK	Proteína cinasa regulada por señales extracelulares
GPCR	Receptor acoplado a proteínas-G heterotriméricas
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GTP	Trifosfato de guanosina
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
RTK	Receptor con actividad de cinasa de tirosina

## 1. Introducción

Toda célula está delimitada por una membrana plasmática que mantiene y controla las condiciones de su medio intracelular con respecto a su entorno o medio extracelular. El surgimiento y posterior evolución de esta membrana no se limitan al establecimiento de una frontera o barrera física, sino que representan el desarrollo de una compleja estructura que permite el intercambio dinámico de materia y energía entre ambos compartimientos. Su organización básica comprende una bicapa lipídica con elementos proteicos asociados. En el presente capítulo se revisa el estatus del modelo de la membrana plasmática, y se destaca la relevancia de los nanodominios denominados balsas de membrana en los mecanismos de transducción de señales asociados con distintos procesos fisiológicos y patológicos.

## 2. Los componentes de la membrana plasmática

Los componentes básicos de la membrana plasmática son lípidos y proteínas. Establecer la proporción, composición y relevancia funcional de estos elementos moleculares representa un gran reto, debido a la inmensa variedad de tipos celulares existentes y a su cambiante composición a través de su ontogenia y su ciclo celular. A pesar de estas dificultades, se han logrado establecer algunas generalidades. Se reconoce, por ejemplo, la heterogeneidad de sus constituyentes lipídicos a lo largo de su superficie y aún entre sus monocapas [1]. En esta última, se destaca la mayor concentración de fosfatidilcolina y esfingomielina en su capa externa y de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina en su contraparte interna. Respecto de sus proteínas constitutivas, se han definido

dos tipos principales: periféricas e integrales. Las primeras se asocian a las caras externa e interna de la membrana plasmática a través de su interacción directa (i. e., fuerzas electrostáticas), de modificaciones postraduccionales (i. e., *lipidaciones*: prenilación, miristoilación o palmitoilación) o por la incorporación de anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Sus proteínas integrales están embebidas completamente en la bicapa lipídica y funcionan como puente o vía de comunicación directa entre el interior y el exterior de la célula. Ello, mediante la conformación de canales y acarreadores que permiten el flujo de iones y pequeñas moléculas, o de receptores que generan mensajeros y cascadas de señalización intracelulares en respuesta a estímulos externos, como hormonas, péptidos, factores de crecimiento y neurotransmisores. Los mecanismos implicados en la localización, el arreglo y la funcionalidad de un tipo particular de lípido, proteína o complejo molecular (lípido-lípido, lípido-proteína o proteína-proteína) en una determinada región de la membrana plasmática, actualmente son investigados desde diferentes perspectivas experimentales y teóricas [2, 3]. Una posibilidad es que dichas características se establezcan a partir de las propiedades intrínsecas de sus componentes (i. e., su tendencia hacia su estado de mínima energía, o por el equilibrio de las fuerzas de atracción y repulsión entre los mismos), que impliquen procesos metabólicos con un costo energético asociado o que resulten de la conjunción de ambos fenómenos [4]. Las características estructurales y funcionales de la membrana plasmática propician su participación en diversos procesos celulares como el transporte y la permeabilidad selectiva de sustancias e iones, la excitabilidad eléctrica, la movilidad, la diferenciación y plasticidad, el reconocimiento intercelular, la secreción de neurotransmisores y la transducción de señales extracelulares. La relevancia de estas características se hace evidente de manera dramática cuando su alteración da lugar a procesos disfuncionales o patológicos [1].

## 3. Estatus del modelo de la membrana plasmática

En su modelo del mosaico fluido, Singer y Nicolson definieron a la membrana plasmática como una bicapa fluida de lípidos que aloja diversos conglomerados proteicos [5]. Este modelo asumía una distribución homogénea y aleatoria de lípidos y proteínas, producto de su libre difusión en el plano bidimensional de la membrana plasmática [Figura 1A], al tiempo que reconocía la asimetría

estructural y funcional entre sus monocapas [5]. El modelo actual de la membrana plasmática no puede dejar de reconocerse como el producto de la constante y dinámica actualización del modelo originalmente propuesto por Singer y Nicolson, que finalmente ha resultado en un nuevo paradigma [6]. Chapman [7], por ejemplo, incorporó el concepto de la segregación lateral de los elementos lipídicos en dominios discretos. Simons y van Meer [8] retomaron más tarde este concepto, al plantear su modelo de dominios lipídicos a partir de sus estudios sobre la distribución diferencial de esfingolípidos en la membrana apical de células epiteliales. Simons e Ikonen [9], posteriormente, reconocieron al colesterol como un elemento indispensable de estos dominios a los que denominaron balsas lipídicas (*lipid rafts*). En su propuesta, Simons e Ikonen establecieron que estos complejos de glicoesfingolípidos-colesterol se mantienen estrechamente empaquetados y se comportan como unidades (i. e., balsas) dentro de la monocapa externa de la membrana plasmática. Actualmente, se acepta que en la membrana plasmática coexisten al menos dos fases fluidas: líquido ordenado (Lo) y líquido desordenado (Ld) [1, 3]. Las balsas de membrana corresponden a la fase Lo y resultan de la interacción de lípidos de cadenas hidrófobas predominantemente saturadas (i. e., esfingolípidos) con moléculas de colesterol. Con respecto a las proteínas constitutivas de la membrana plasmática, Simons e Ikonen, postularon que algunas podrían hallarse in-

cluidas o ancladas a las balsas de membrana, en función de sus características moleculares y de sus propiedades termodinámicas. El concepto original de balsas lipídicas (*lipid rafts*) fue posteriormente sustituido por el de balsas de membranas (*membrane rafts*) [10], al reconsiderarse la relevancia de sus componentes proteicos. Las balsas de membrana o *rafts* quedaron entonces definidas como: “dominios pequeños (2-200 nm de diámetro), heterogéneos, ricos en colesterol y esfingolípidos, que compartimentan una gran variedad de procesos celulares. Estos nanodominios pueden estabilizarse y generar plataformas de mayor tamaño a través de interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y/o proteína-proteína” [Figura 1B]. Se reconocen dos tipos principales de estos nanodominios: balsas planas y caveolas. Los primeros se caracterizan por su pequeño tamaño (2-20 nm de diámetro) y su gran dinamismo (vida media de 1-2 s). Las caveolas corresponden a invaginaciones de la membrana plasmática de mayor dimensión (50-200 nm de diámetro) y estabilidad (vida media > minutos), caracterizadas adicionalmente por la presencia de las proteínas cavininas y caveolinas [1, 9]. Utilizando la técnica de seguimiento de molécula única, Kusumi y su grupo [6] establecieron, más tarde, que tanto las proteínas como los lípidos constitutivos de la membrana plasmática exhiben dos patrones de difusión característicos, uno de corto alcance (o confinado a un compartimento) y otro de largo alcance (o de escape entre compartimentos), donde

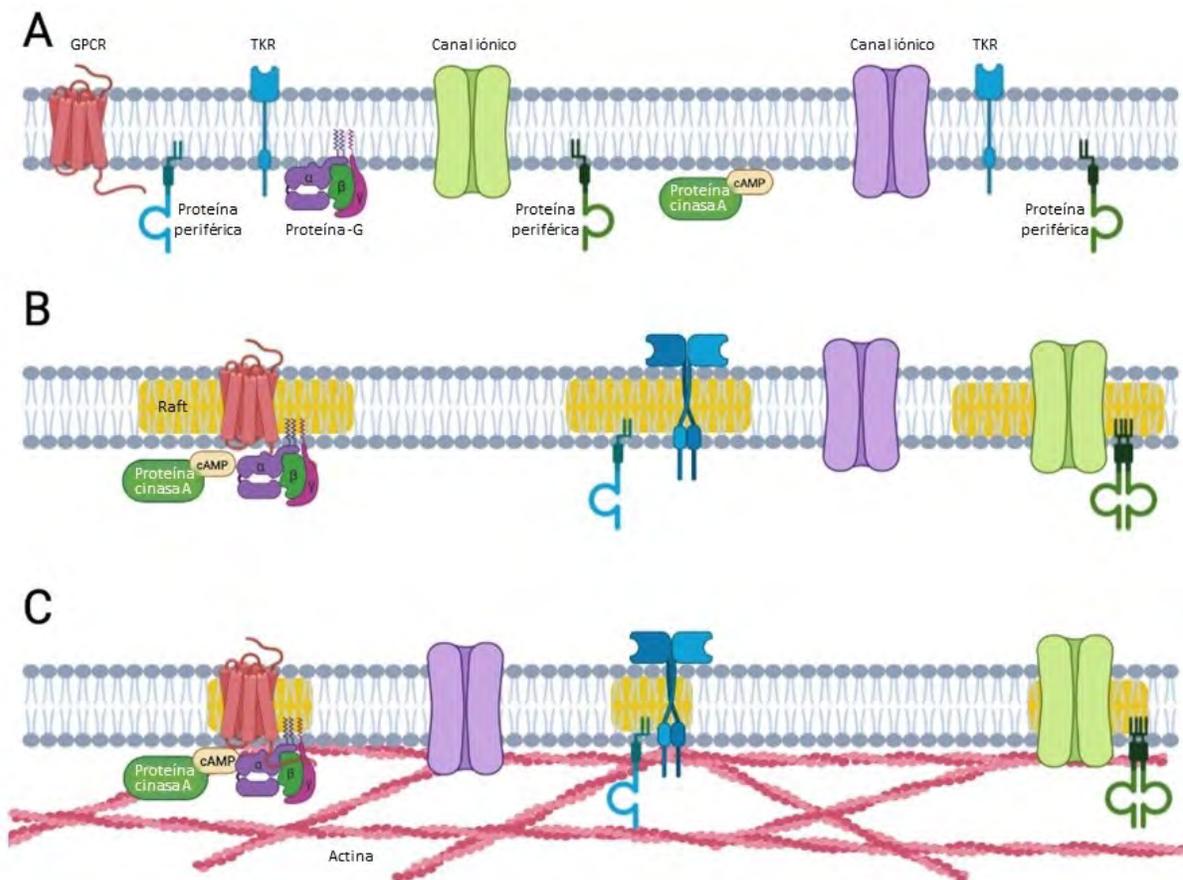


Figura 1. Modelos emblemáticos de la membrana plasmática. A) Mosaico fluido de Singer y Nicolson, 1972 [5]. B) Balsas de membrana de Simons e Ikonen, 1997 [9]. C) Corrales de membrana de Kusumi y cols., 2005 [6].

el coeficiente de difusión del segundo es ~20 veces menor que el del primero. La explicación para esta diferencia, propuesta por Kusumi y sus colaboradores, es que la superficie de la membrana plasmática se halla dividida en pequeñas parcelas o corrales, lo que obstaculiza la difusión de lípidos y proteínas entre ellos. En este arreglo, las proteínas integrales que sobresalen en el lado citoplásmico de la membrana funcionan como postes que interactúan con los filamentos de actina del citoesqueleto, dando lugar al confinamiento de pequeñas áreas (~40-300 nm de diámetro) en la cara interna de la membrana plasmática. Estos corrales limitan tanto la difusión de las proteínas (integrales y periféricas) como la de los fosfolípidos constitutivos en ambas monocapas de la membrana [Figura 1C]. El modelo asume que las balsas de membrana o *rafts* se alojan al interior de estos corrales [1, 3, 4] y que las mismas abarcan entre el 1-10% de la superficie total de la membrana plasmática. La significancia funcional de los corrales y los *rafts* se sustenta en la compartimentación de procesos a la que dan lugar, propiciando su mayor especificidad y eficiencia. En particular, se les ha adjudicado un papel importante en la organización espacial y temporal de los elementos involucrados en la transducción de señales extracelulares [1, 9, 10, 11].

#### 4. Nanodominios de membrana y señalización

Desde su planteamiento, la hipótesis de las balsas de membrana ha destacado su relevancia en la transducción de señales extracelulares [9, 10]. La posibilidad de promover la convergencia de los distintos elementos involucrados en las cascadas de señalización ha resultado una propuesta muy atractiva. En este sentido, las condiciones dentro del contorno de las balsas de membrana propiciarían, en primera instancia, la colocalización e interacción de los elementos de una determinada vía de señalización que, bajo otras circunstancias, sería muy poco probable que pudiesen ocurrir. Alternativamente, el confinamiento de determinados elementos al interior de estos dominios podría modificar sus propiedades o características y limitar su disponibilidad y participación en diversos procesos de señalización, confiriéndole a las balsas de membrana un papel modulador de estos últimos. Actualmente se reconoce la relevancia de las balsas de membrana en diversas vías de transducción entre las que destacan las asociadas a receptores acoplados a proteínas G, receptores con actividad de cinasa de tirosina y receptores del sistema inmune [11].

#### 5. GPCRs asociados a nanodominios de membrana

La familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés) abarca el mayor número de proteínas de membrana en las células de los vertebrados [12]. Esta familia de proteínas también es conocida como receptores de 7 pasos transmembranales o receptores 7M. Su estructura general comprende un polipéptido con un extremo amino terminal extracelular, un extremo carboxilo terminal intracelular y 7 dominios transmembranales hidrófobos conectados por 3 asas extracelulares y 3 asas intracelulares. La familia de los GPCRs incluye 6 clases (A-F) y abarca una

diversa gama de receptores. Funcionalmente, los GPCRs destacan por su papel como receptores para neurotransmisores, péptidos, hormonas, estímulos gustativos, odorantes e incluso fotones. Constituyen, asimismo, el principal blanco de los fármacos utilizados en la clínica médica [13]. Su mecanismo de activación implica la unión de su agonista a la parte extracelular del receptor, lo que propicia su cambio conformacional y el recambio de una molécula de difosfato de guanosina (GDP) por una de trifosfato de guanosina (GTP) en la subunidad  $G_{\alpha}$  del trímero de proteínas  $G_{\alpha\beta\gamma}$  que se halla unido a la parte intracelular del receptor. Este recambio de nucleótidos promueve la disociación del trímero en sus subunidades  $G_{\alpha}$ -GTP y  $G_{\beta\gamma}$ , dos importantes mensajeros citoplásmicos, que participan en diversos procesos a través de la activación y/o generación de moléculas de señalización o segundos mensajeros como: monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), proteína cinasa A (PKA), fosfolipasa C (PLC), 4,5 bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP2), 1,4,5 trisfosfato de inositol (IP3), diacilglicerol (DG) y proteína cinasa C (PKC), entre otras [14]. Este modelo de señalización asociado a la activación de los GPCRs se considera prototipo de los procesos de amplificación y divergencia que suelen generarse a partir de la transducción de señales extracelulares.

Se conoce que un número importante de GPCRs se asocian con balsas de membrana [Tabla 1], y que esta asociación depende de la integridad y constitución de estos nanodominios, ya que su alteración o disociación resulta en la eliminación o atenuación de las señalizaciones generadas a partir de estos receptores [11, 15, 16]. Una estrategia experimental ampliamente utilizada para explorar dicha dependencia consiste en modificar el contenido de colesterol de la membrana plasmática, dado que este es uno de sus principales componentes lipídicos y elemento crítico en la constitución de las balsas de membrana [9, 10]. Las variaciones en el nivel de colesterol de la membrana plasmática (particularmente del asociado con estos nanodominios) se han relacionado con alteraciones funcionales en los GPCRs que afectan la unión a su ligando, su acoplamiento con las proteínas G y su capacidad de generar cascadas de señalización [Figura 2A]. Los mecanismos moleculares implicados incluyen la interacción directa del colesterol con los GPCRs a través de sitios específicos de reconocimiento, cambios en las propiedades biofísicas de la membrana que circunda a estos receptores o bien la combinación de ambos factores [17].

Entre los GPCRs asociados a dominios de membrana destacan los receptores para 5-hidroxitriptamina o serotonina [18]. La serotonina es un neurotransmisor implicado en procesos de desarrollo, cognitivos y de comportamiento. Sus ligandos (agonistas y antagonistas) representan por lo tanto moléculas con potencial terapéutico para el tratamiento de estrés, ansiedad y depresión. Se conocen catorce tipos distintos de receptores para serotonina que se distribuyen ampliamente en el sistema nervioso central y periférico [19]. Todos los receptores para serotonina corresponden a GPCRs, excepto el receptor 5HT<sub>3</sub> que es un receptor-canal o receptor ionotrópico. La relevancia de las balsas de membrana en la organización, la dinámica, el funcionamiento y la señalización de los receptores para serotonina ha sido investigada de manera particular en los receptores 5HT<sub>1A</sub> [20]. En preparaciones de hipo-

Tabla 1. GPCRs asociados a nanodominios de membrana.

Receptor	Clase	Proteína G acoplada	Referencias
Serotonina (5-HT <sub>1A</sub> )	A	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pucadyil and Chattopadhyay, <i>Biochim Biophys Acta</i>. 2004; 1663:188-200.</li> <li>Jafurulla <i>et al.</i>, <i>Adv Exp Med Biol</i>. 2019; 1115:21-52.</li> </ul>
Serotonina (5-HT <sub>2A</sub> )	A	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> principal G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bhatnagar <i>et al.</i>, <i>Biol Chem</i>. 2004; 279:34614-34623.</li> <li>Mialet-Perez <i>et al.</i>, <i>J Mol Cell Cardiol</i>. 2012; 52:502-510</li> </ul>
Adenosina (A <sub>1</sub> )	A	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> secundaria G <sub>s</sub> secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gines <i>et al.</i>, <i>Mol Pharmacol</i>. 2001; 59:1314-1323.</li> <li>Lasley <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 2000; 275:4417-4421.</li> </ul>
Adenosina (A <sub>2</sub> )	A	G <sub>s</sub> principal G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Guixà-González <i>et al.</i>, <i>Nat Commun</i>. 2017; 8:14505.</li> <li>McGraw <i>et al.</i>, <i>Biochim. Biophys Acta Biomembr</i>. 2019; 1861:760-767</li> </ul>
α <sub>1</sub> adrenérgico	A	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> principal G <sub>12</sub> /G <sub>13</sub> secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Morris <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 2008; 283:2973-2985.</li> <li>Lei <i>et al.</i>, <i>Cell Signal</i>. 2009; 21:1532-1539.</li> </ul>
β <sub>1</sub> adrenérgico	A	G <sub>s</sub> principal G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rybin <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 2000; 275:41447-41457.</li> <li>Agarwal <i>et al.</i>, <i>Mol Cell Cardiol</i>. 2011; 50:500-509.</li> </ul>
β <sub>2</sub> adrenérgico	A	G <sub>s</sub> principal G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rybin <i>et al.</i> <i>J Biol Chem</i>. 2000; 275:41447-41457.</li> <li>Paila <i>et al.</i>, <i>Biochim Biophys Acta</i>. 2011; 1808:461-465.</li> </ul>
Angiotensina (AT <sub>1</sub> )	A	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Wyse <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 2003; 278:23738-23746.</li> <li>Tyan <i>et al.</i>, <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i>. 2021; 320:H787-H797.</li> </ul>
Bradicinina (B <sub>1</sub> )	A	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lamb <i>et al.</i>, <i>Biochemistry</i>. 2002; 41:14340-14347.</li> </ul>
Bradicinina (B <sub>2</sub> )	A	G <sub>s</sub> principal G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lamb <i>et al.</i>, <i>Biochemistry</i>. 2002; 41:14340-14347.</li> <li>Calizo and Scarlata, <i>Biochemistry</i>. 2012; 51:9513-9523.</li> </ul>
Cannabinoide (CB <sub>1</sub> )	A	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal G <sub>s</sub> secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bari <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 2005; 280:12212-12220</li> <li>Oddi <i>et al.</i>, <i>Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids</i>. 2017; 1862:523-532.</li> </ul>
Cannabinoide (CB <sub>2</sub> )	A	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal G <sub>s</sub> secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Yeliseev <i>et al.</i>, <i>Sci. Rep</i>. 2021; 11:3706-3718.</li> </ul>
Colecistoquinina (CCK)	A	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> principal G <sub>s</sub> secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gimpl <i>et al.</i>, <i>Biochemistry</i>. 1997; 36:10959-10974.</li> <li>Potter <i>et al.</i>, <i>J Lipid Res</i>. 2012; 53:137-148.</li> </ul>
Dopamina (D <sub>1</sub> )	A	G <sub>s</sub> primario	<ul style="list-style-type: none"> <li>Yu <i>et al.</i>, <i>Kidney Int</i>. 2004; 66:2167-2180.</li> <li>Tiu <i>et al.</i>, <i>FASEB J</i>. 2020; 34:6999-7017.</li> </ul>
Endotelina (ET <sub>A</sub> )	A	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Okamoto <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 2000; 275: 6439-6446.</li> <li>Gambara <i>et al.</i>, <i>J Cell Physiol</i>. 2008; 216: 396-404.</li> </ul>
Endotelina (ET <sub>B</sub> )	A	G <sub>s</sub> principal G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Teixeira <i>et al.</i>, <i>J Neurochem</i>. 1999; 72:120-128.</li> <li>Gambara <i>et al.</i>, <i>J Cell Physiol</i>. 2008; 216:396-404</li> </ul>
GABA <sub>B</sub>	C	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal G <sub>s</sub> secundaria G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Huo <i>et al.</i>, <i>Epilepsia</i>. 2009; 50:776-788.</li> <li>Beecher <i>et al.</i>, <i>J Neurochem</i>. 2001; 79:787-795.</li> </ul>
Galanina (GAL2)	A	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pang <i>et al.</i>, <i>Biochemistry</i>. 1999; 38:12003-12011.</li> </ul>
Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	A	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Navratil <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 2003; 278:31593-31602.</li> <li>Koklic <i>et al.</i>, <i>Molecules</i>. 2021; 26:973</li> </ul>
Muscarínico (M <sub>2</sub> )	A	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Feron <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 1997; 272:17744-17748</li> <li>Schwarzer <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 2010; 285:27817-27826.</li> </ul>
Neurocinina (NK <sub>1</sub> )	A	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> principal G <sub>s</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Monastyrskaya <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 2005; 280:7135-7146</li> <li>Licon <i>et al.</i>, <i>Pflugers Arch</i>. 2015; 467:1699-1709.</li> </ul>
δ-opioide	A	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Huang <i>et al.</i>, <i>Brain Res</i>. 2007; 1184:46-56.</li> <li>Levitt <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem</i>. 2009; 284:22108-22122.</li> </ul>

Receptor	Clase	Proteína G acoplada	Referencias
$\kappa$ -opioides	A	$G_i/G_o$ principal $G_{12}/G_{13}$ secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zhao <i>et al.</i>, <i>Mol Pharmacol.</i> 2006; 69:1421-1432 .</li> <li>• Mazahery <i>et al.</i>, <i>Immunohorizons.</i> 2020; 4:420-429.</li> </ul>
Oxitocina	A	$G_q/G_{11}$ secundaria $G_i/G_o$ principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gimpl <i>et al.</i>, <i>Biochemistry.</i> 1997; 36:10959-10974.</li> <li>• Lemel <i>et al.</i>, <i>J Lipid Res.</i> 2021; 62:100059</li> </ul>
Somatostatina (SST2)	A	$G_i/G_o$ principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bhatnagar <i>et al.</i>, <i>Biol Chem.</i> 2004; 279:34614-34623.</li> <li>• Mialet-Perez <i>et al.</i>, <i>J Mol Cell Cardiol.</i> 2012; 52:502-510</li> </ul>
Esfingosina (EDG-1)	A	$G_i/G_o$ principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Igarashi and Michel, <i>J Biol Chem.</i> 2000; 275:32363-32370</li> </ul>

campo de bovinos, por ejemplo, se ha observado que la aplicación de metil- $\beta$ -ciclodextrina, un fármaco utilizado para extraer el colesterol de la membrana plasmática, disminuye la afinidad del receptor por su agonista 8-OH-DPAT, efecto que es revertido al reincorporar el colesterol a la membrana plasmática de dicha preparación [21]. Por otra parte, en células NIH-3T3 que expresaban de manera estable el receptor  $5HT_{1A}$ , el fraccionamiento de sus membranas mostró que este receptor se localiza preferentemente en las fracciones de baja densidad y resistentes a la acción de detergentes no-iónicos (fracciones que en principio corresponden a la fase líquido ordenado o de balsas de membrana) junto con la proteína caveolina-1. Resulta interesante que la colocalización de estas proteínas dependa del estado de palmitoilación de los receptores  $5HT_{1A}$  [22], lo que apoya su asociación con las balsas de membrana. La interacción de los receptores  $5HT_{1A}$  con caveolina-1 se ha observado en otras preparaciones, independientemente de si estas proteínas son expresadas de manera endógena o son transfectadas. En otros estudios, realizados en células CHO que expresaban el receptor  $5HT_{1A}$ , la aplicación crónica de los inhibidores de la vía de síntesis del colesterol AY9944 o mevastatina [23] alteró la afinidad de los receptores  $5HT_{1A}$  por su ligando y atenuó su acoplamiento y señalización mediados por proteínas G, sin que se observaran cambios en el nivel de expresión de estos receptores. Este efecto fue también revertido al reintegrar el colesterol a la membrana plasmática de estas células. Otro aspecto que ha sido explorado con mucho interés es la posibilidad de que el nivel de colesterol de la membrana plasmática pudiera regular la formación de oligómeros de receptores, condición que en algunos GPCRs propicia una mayor eficiencia en su capacidad de traducir señales extracelulares, al promover el entrecruzamiento (*crosstalk*) entre dímeros de GPCRs homólogos o heterólogos [24]. Para los receptores  $5HT_{1A}$  se sabe que los niveles basales de colesterol y la unión de sus agonistas favorecen la formación de oligómeros, mientras que la extracción de colesterol de la membrana plasmática y la unión de sus antagonistas disminuyen su formación. Estas características pudieran ser relevantes en el diseño de nuevas terapias farmacológicas relacionadas con los GPCRs asociados a las balsas de membrana.

Los receptores para neurocininas tipo 1 ( $NK_1$ ) representan otro ejemplo de GPCRs asociados a nanodominios de membrana. Los receptores  $NK_1$  participan en procesos de nocicepción, inflamación, secreción exógena y contracción del músculo liso. Su activación por sustancia-P promueve la relocalización de la PKC (una de las cinasas implicadas en su cascada de señalización) des-

de el citoplasma hacia las balsas de membrana (*rafts/caveolas*). Esta acción es regulada por los niveles de colesterol en la membrana plasmática, ya que es inhibida por la extracción de colesterol con metil- $\beta$ -ciclodextrina [25]. En este mismo sentido, el efecto inhibitorio promovido por la activación de los receptores  $NK_1$  sobre los canales neuronales  $Ca_v2.3$ , expresados en células HEK293, también depende de los niveles de colesterol en la membrana plasmática [26].

Los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos son otro grupo importante de receptores que se asocian con dominios de membrana. En miocitos cardíacos se ha observado que estos receptores se localizan en caveolas e incrementan su señalización en respuesta a una disminución en los niveles de colesterol de la membrana plasmática [27]. Esta observación sugiere una modulación negativa de estos nanodominios sobre la señalización de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos en los miocitos cardíacos. La formación de homodímeros de estos receptores también es dependiente de la concentración de colesterol de la membrana plasmática. En este caso, el modelaje por dinámica molecular [28] indica cambios en la conformación de los dominios transmembranales responsables de la dimerización de estos receptores e incluso señala la participación de diferentes dominios, en función de la concentración del colesterol en la membrana plasmática. Lo anterior podría resultar relevante en el tratamiento o diseño farmacológico, dada la conocida variación en el contenido de colesterol en las membranas celulares con el transcurso de la edad. Es decir, la eficacia de un fármaco podría cambiar como resultado del proceso de envejecimiento del paciente.

Como se mencionó anteriormente, se reconoce que una amplia gama de GPCRs son regulados a través de su asociación con nanodominios de membrana [Tabla 1]. En su conjunto, estos reportes indican que la asociación de este grupo de GPCRs con *rafts* o caveolas es condición indispensable para su eficiente o regulada transducción de señales [Figura 2A].

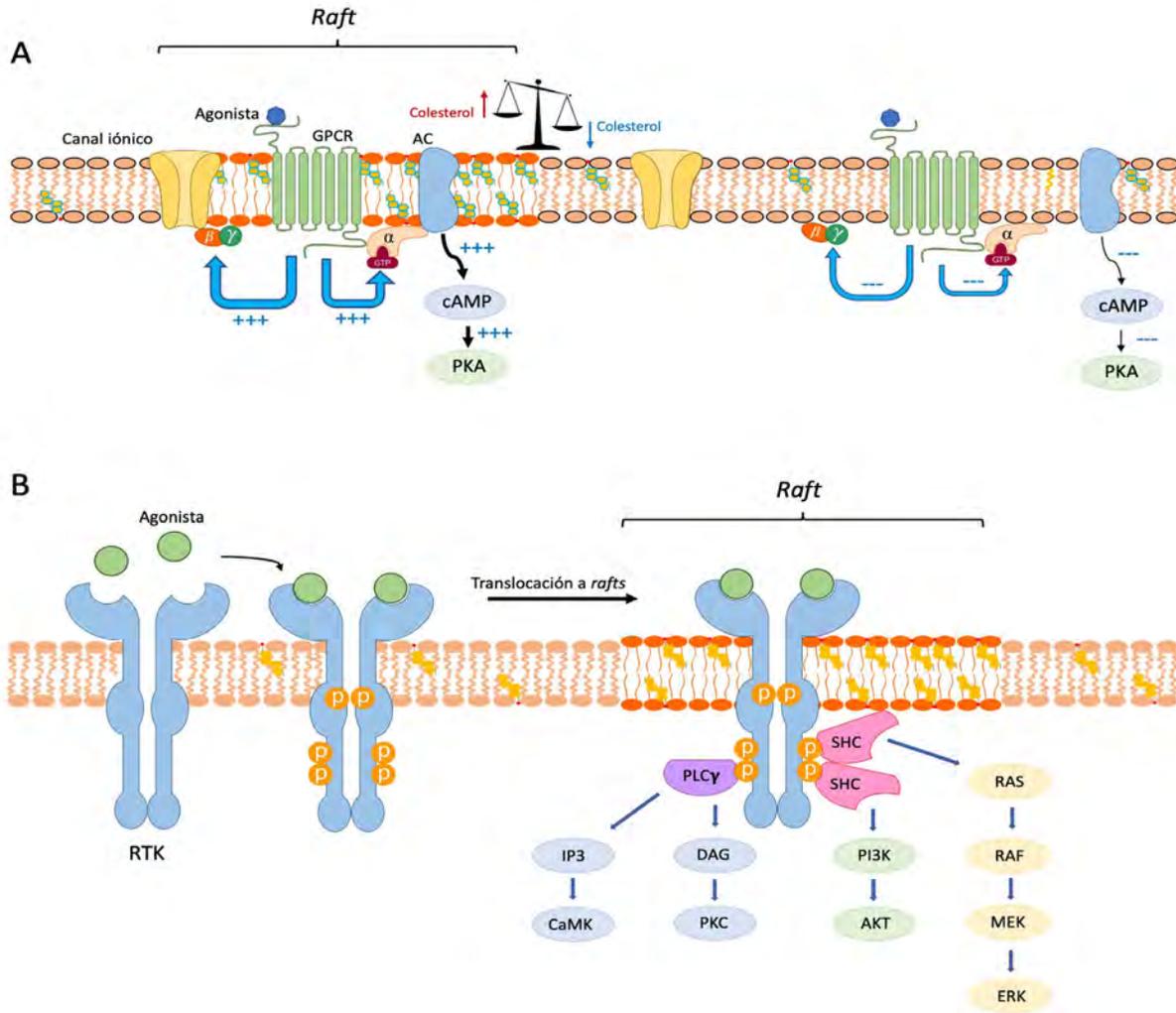


Figura 2. Relevancia de los rafts en las señalizaciones mediadas por GPCRs y RTKs. Algunos complejos de señalización, como los asociados a los GPCRs, se alojan preferentemente en rafts (A), mientras que otros, como los de los RTKs, se translocan a estos después de la unión de su agonista (B). cAMP, monofosfato cíclico de adenosina; PKA, proteína cinasa A; PLC $\gamma$ , fosfolipasa C gamma; IP $_3$ , 1,4,5 trisfosfato de inositol; CaMK, proteína cinasa dependiente de Ca $^{2+}$ /calmodulina; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína cinasa C; PI3K, fosfoinositol 3-cinasa; MEK, proteína cinasa activada por mitógenos, ERK, proteína cinasa regulada por señales extracelulares; RAS, proteína del sarcoma viral de rata; AKT, proteína serina-treonina cinasa.

### 6. Nanodominios y receptores con actividad de cinasa de tirosina

Los receptores ligados a enzimas son proteínas transmembranales con dominios intracelulares asociados a una entidad catalítica. En algunos casos, su propio dominio intracelular funciona como enzima. La familia predominante de estos receptores la conforman aquellos con actividad de cinasa de tirosina (RTKs, por sus siglas en inglés). Los RTKs están involucrados en procesos esenciales, como la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, el metabolismo, la migración y el control del ciclo celular. En el ser humano se conocen 58 RTKs y se clasifican en 20 subfamilias. Todos comparten una arquitectura molecular: dominios de unión para ligandos en la región extracelular, una única  $\alpha$ -hélice transmembranal y una región citoplásmica con actividad de cinasa de

tirosina. En general, la unión de su ligando (hormona o factor de crecimiento) induce su dimerización, la autofosforilación de sus dominios citoplásmicos y la generación de señalizaciones intracelulares que regulan diversos aspectos de la fisiología celular, entre las que se incluyen las vías Ras-MAPKs, fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)-Akt-mTOR, fosfolipasa C (PLC), JAK-STAT y Rho-GTPasas. Una excepción a este patrón la constituyen los receptores para IGF1 (del inglés *insulin-like growth factor 1*) e insulina que se expresan en la superficie celular como dímeros. La unión de IGF1 o insulina induce cambios conformacionales en estos receptores que estimulan su actividad de cinasa y la señalización celular [29]. Al igual que los GPCRs, diversos RTKs se asocian con las balsas de membrana (*rafts* y/o caveolas) [Tabla 2] y dicha asociación puede afectar su capacidad de transducción de señales [Figura 2B].

Tabla 2. RTKs asociados a nanodominios de membrana.

Receptor	Subfamilia	Referencias
EGFR (Factor de crecimiento epidérmico)	ErbB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Roepstorff <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem.</i> 2002; 277:18954-18960.</li> <li>• Pike <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem.</i> 2005; 280:26796-26804.</li> </ul>
ErbB2 ( <i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2</i> )	ErbB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nagy <i>et al.</i>, <i>J Cell Sci.</i> 2002; 115:4251-4262.</li> <li>• Brown and Hansen, <i>Otol Neurotol.</i> 2008; 29:79-85.</li> </ul>
ErbB2 ( <i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4</i> )	Ins	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ma <i>et al.</i>, <i>J Neurosci.</i> 2003; 23:3164-3175.</li> </ul>
InsR (Insulina)	Ins	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vainio <i>et al.</i>, <i>EMBO Rep.</i> 2002; 3:95-100.</li> <li>• Morino-Koga <i>et al.</i>, <i>J Cell Physiol.</i> 2013; 228:439-446.</li> </ul>
IGF1R (Factor de crecimiento similar a la insulina)	Ins	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Huo <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem.</i> 2003; 278:11561-11569.</li> <li>• Hong <i>et al.</i>, <i>Cell Death Differ.</i> 2004; 11:714-723.</li> </ul>
PDGFR (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)	PDGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Szöör <i>et al.</i>, <i>Cell Signal.</i> 2016; 28:81-93.</li> <li>• Seong <i>et al.</i>, <i>Sci Rep.</i> 2017; 7:1593.</li> </ul>
VEGFR1 (Factor de crecimiento endotelial vascular)	VEGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stalin <i>et al.</i>, <i>Cardiovasc Res.</i> 2016; 111:240-251.</li> <li>• Failla <i>et al.</i>, <i>Int J Mol Sci.</i> 2018; 19:1306.</li> </ul>
VEGFR2 (Factor de crecimiento endotelial vascular)	VEGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Saulle <i>et al.</i>, <i>Br J Haematol.</i> 2009; 145:399-411.</li> <li>• Zabroski and Nugent, <i>Int J Mol Sci.</i> 2021; 22:798.</li> </ul>
FGFR1 (Factor de crecimiento de fibroblastos)	FGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asimaki <i>et al.</i>, <i>J Neurochem.</i> 2011; 116:866-873.</li> </ul>
FGFR2 (Factor de crecimiento de fibroblastos)	FGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bryant <i>et al.</i>, <i>Glia.</i> 2009; 57:935-946.</li> </ul>
PTK7 ( <i>Protein Tyrosine Kinase 7</i> )	PTK7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chen <i>et al.</i>, <i>Anal Chem.</i> 2021; 93:936-945.</li> </ul>
TrkA (Neurotrofinas)	Trk	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limpert <i>et al.</i>, <i>Mol Cell Biol.</i> 2007; 27:5686-5698.</li> <li>• Ichikawa <i>et al.</i>, <i>J Cell Sci.</i> 2009; 122:289-299.</li> </ul>
TrkB (Neurotrofinas)	Trk	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suzuki <i>et al.</i>, <i>J Cell Biol.</i> 2004; 167:1205-1215.</li> <li>• Pereira and Chao, <i>J Neurosci.</i> 2007; 27:4859-4869.</li> </ul>
MuSK ( <i>Muscle-Specific Kinase</i> )	MuSK	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zhu <i>et al.</i>, <i>J Neurosci.</i> 2006; 26:4841-4851.</li> </ul>
Met ( <i>Mesenchymal-epithelial transition factor</i> )	Met	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lu and Chen, <i>J Biomed Sci.</i> 2011; 18:78.</li> <li>• Lin <i>et al.</i>, <i>J Biol Chem.</i> 2012; 287:20664-20673.</li> </ul>
Tie2 ( <i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2</i> )	Tie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Katoh <i>et al.</i>, <i>Exp Cell Res.</i> 2009; 315:2818-2823</li> </ul>
EphB1 (Efrinas)	Eph	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vihanto <i>et al.</i>, <i>J Cell Sci.</i> 2006; 119:2299-2309.</li> </ul>
RET ( <i>REarranged during Transfection</i> )	Ret	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tansey <i>et al.</i>, <i>Neuron.</i> 2000; 25:611-623.</li> <li>• Paratcha <i>et al.</i>, <i>Neuron.</i> 2001; 29:171-184.</li> </ul>
DDR1 ( <i>Discoidin domain receptor family, member 1</i> )	DDR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Xu <i>et al.</i>, <i>Biol Open.</i> 2019; 8:bio041913.</li> </ul>

En general, los RTKs no se recuperan en las fracciones de membrana resistentes a detergentes. Sin embargo, cuando se utilizan métodos libres de detergentes, estos receptores se particionan en bandas de membrana de baja densidad, sugiriendo su asociación con nanodominios. En promedio, ~50% del total de los RTKs pueden ser recuperados en estas fracciones, es decir, aun cuando están presentes en las fracciones que corresponden a balsas de membrana, no parecen estar localizados exclusivamente en estos compartimentos [30]. El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) fue de los primeros RTKs en ser localizado en fracciones de baja densidad de las membranas celulares. Inicialmente, se sugirió su presencia en caveolas [31], pero estudios posteriores de microscopía electrónica mostraron que se localiza principalmente en balsas planas o *rafts* [32]. Como ya se ha mencionado, la alteración del nivel de colesterol de la membrana plasmática puede afectar el funcionamiento de diversos receptores al modificar la organización de los dominios en que

puudiesen encontrarse junto con sus elementos de señalización. Para el EGFR se ha reportado que una disminución del contenido de colesterol de la membrana promueve la unión a su ligando, su dimerización y su activación [32]. En consistencia con estos resultados, la activación de las MAPKs a través de este receptor se ve incrementada en células tratadas con metil- $\beta$ -ciclodextrina. La inhibición de los EGFRs, por su localización en las balsas de membrana, parece contribuir al balance de la señalización que generan estos receptores, ya que su sobreactivación se ha asociado con el desarrollo y la progresión de tumores [33]. Recientemente, se reportó que CD137, una proteína implicada en la generación de tumores y que está sobreexpresada en diversos tipos de cáncer, estimula la progresión del ciclo celular y aumenta el potencial cancerígeno de células de carcinoma hepático a través de la regulación del EGFR. En el mecanismo propuesto, la incorporación de CD137 a las balsas de membrana, mediada por un ancla de GPI, promueve la liberación de EGFR de estos nanodominios e induce

su activación y el inicio de diversas vías de señalización que incluyen Ras-Raf-MAPK y JAK-STAT [34]. Otros estudios relacionados con EGFR, en contraste, han reportado que la reducción del contenido de colesterol de la membrana celular atenúa la señalización mediada por estos receptores [35]. A la fecha, no se cuenta con una explicación satisfactoria para estas observaciones contrapuestas.

Otro miembro de la subfamilia ErbB, el receptor ErbB4, es reclutado en las balsas de membrana tras la unión de su agonista neuroregulina (NRG), el que además promueve la translocación de otras moléculas de señalización asociadas a ErbB4 [Figura 2B]. En neuronas de hipocampo de rata se observó que la disminución del contenido de colesterol en la membrana plasmática inhibió la activación de ERK (una de las proteínas de la vía de señalización de ErbB4) inducida por NRG, así como la acción inhibitoria de este mismo agonista sobre la cascada de señalización que induce potenciación a largo plazo, evidenciando la importancia de los *rafts* en la señalización mediada por ErbB4 [36].

El receptor para el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), TrkB, es otro ejemplo de RTK asociado con nanodominios de membrana. El BDNF se une con alta afinidad al receptor TrkB y activa diversas vías de señalización (i. e., PI3K-Akt, ERK-MAPK y fosfolipasa C- $\gamma$ ) que promueven la supervivencia, la diferenciación y regulación de la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal [37]. Suzuki y colaboradores [38], mostraron que la unión del BDNF al receptor TrkB induce su translocación a nanodominios en neuronas corticales y que este efecto es suprimido por el compuesto K252a, un inhibidor de la actividad de cinasa de los receptores TrkB. Acerca de los residuos de tirosina presentes en el dominio intracelular de los receptores TrkB, se sabe que sirven (una vez fosforilados) como sitios de andamiaje para diversas proteínas de las vías de señalización que activan estos receptores (ver arriba). Aun cuando los receptores TrkB no se acompañan de dichas proteínas durante su translocación a las balsas de membrana, sí se observa un aumento paralelo en la activación de ERK, sugiriendo que la translocación del receptor, por sí misma, es clave en la señalización de TrkB. Funcionalmente, la unión del BDNF a los receptores TrkB genera acciones a corto plazo, como el aumento de la liberación de neurotransmisores, y a largo plazo, como la regulación de la supervivencia neural y el crecimiento axonal. En neuronas corticales en cultivo, el tratamiento con metil- $\beta$ -ciclodextrina atenúa el reclutamiento de receptores TrkB en balsas de membrana inducido por BDNF, con la consecuente disminución en la liberación del neurotransmisor (glutamato), sugiriendo la relevancia de estos dominios en dicho evento. Por otra parte, no en todas las acciones de largo plazo del BDNF parecen estar involucradas las balsas de membrana, ya que la supervivencia neuronal no se modifica por el tratamiento con mevastatina y pravastatina, ambos inhibidores de la síntesis de colesterol. Sin embargo, el tratamiento con mevastatina sí afecta el crecimiento axonal inducido por BDNF [38].

Otros estudios reportaron inicialmente que el receptor TrkA, otro miembro de la familia de receptores para neurotrofinas, se localiza de manera constitutiva en caveolas y que la unión de su agonista, el factor de crecimiento nervioso (NGF), no altera su localización en la membrana plasmática [39]. Sin embargo, estudios

posteriores mostraron que, similar a lo que ocurre con el receptor TrkB, el receptor TrkA también es reclutado en *rafts* después de la unión del NGF, a través de un proceso que involucra a la proteína flotilina. La translocación del TrkA a las balsas planas o *rafts* resulta importante para la activación eficiente de la vía de ERK [40].

Los receptores RET (del inglés *REarranged during Transfection*) también se asocian con dominios de membrana. A diferencia de la mayoría de los RTKs, los receptores RET no unen su ligando directamente, sino que requieren de un correceptor para ser activados. Su correceptor es la proteína GFR $\alpha$ 1 (del inglés *GDNF family receptor alpha-1*) que une con alta afinidad a su agonista, el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). En células que coexpresan los receptores RET y GFR $\alpha$ 1, la unión del GDNF a GFR $\alpha$ 1 induce la dimerización heteróloga de los receptores y la activación de RET (señalización *cis*). Alternativamente, se ha observado que el receptor GFR $\alpha$ 1 se expresa en células que no presentan el receptor RET, pero que, por mecanismos desconocidos hasta ahora, pueden unir al GDNF y activar RET en neuronas vecinas (señalización *trans*). En las células que coexpresan RET y GFR $\alpha$ 1, la unión de GDNF a GFR $\alpha$ 1 induce la translocación de RET a dominios de membrana, independientemente de la actividad cinasa del receptor, mientras que en la señalización *trans* los receptores RET son translocados a los dominios de membrana de una manera dependiente de su actividad cinasa. Estos mecanismos promueven la asociación de RET con diferentes proteínas de señalización dentro de los *rafts* y propician la supervivencia y diferenciación celular [41, 42]. Finalmente, también se ha demostrado que la remodelación del citoesqueleto representa un evento esencial en la señalización inducida por GDNF, al promover la redistribución de RET hacia las balsas de membrana [43].

## 7. Los dominios de membrana como blancos terapéuticos

### 7.1. Enfermedades neurológicas asociadas a balsas de membrana y señalización por GPCRs

En el sistema nervioso, la alteración en la composición y estructura de las balsas de membrana se ha asociado con la distribución y agregación anormal de proteínas, la desregulación de señalizaciones y con otros eventos implicados en diversas enfermedades neurológicas [Tabla 3]. Los mecanismos involucrados en estas disfunciones son materia de investigación en diferentes escenarios y contextos fisiopatológicos.

En cuanto a enfermedades neurológicas o psiquiátricas que involucran la afectación de vías de señalización por proteínas G asociadas a balsas de membrana, aun cuando existen pocos estudios al respecto, destaca la caracterización de los mecanismos de acción de los fármacos antidepresivos, un área de investigación muy atractiva, que abre la posibilidad de nuevos enfoques en la planeación y desarrollo de estrategias terapéuticas.

En el tejido nervioso de pacientes con desórdenes depresivos se ha reportado un alto grado de asociación entre G $\alpha_s$  y balsas de membrana y una baja concentración de AMPc [44]. Esta condición se ha adjudicado a un estadio atenuado o inhibido de la vía

Tabla 3. Enfermedades neurológicas asociadas con alteraciones en las balsas de membrana.

Neuropatología	Modificaciones	Referencias
Alzheimer	Formación de placas $\beta$ -amiloideas ↓ ácidos grasos poliinsaturados	• Eehalt <i>et al.</i> , 2003; <i>J. Cell Biol.</i> 160:113–123. • Chew <i>et al.</i> , 2020, <i>Front Physiol.</i> 11:598.
Parkinson	↑ ácidos grasos saturados ↓ cerebrósidos Internalización de proteína $\alpha$ -sinucleína	• Hashimoto <i>et al.</i> , 2003; <i>J Neurochem.</i> 85:1468–1479
Huntington	↓ colesterol ↓ gangliósido GM1 ↑ proteína huntingtina mutada	• Valencia <i>et al.</i> , 2010; <i>J Neurosci Res.</i> 88:179-190.
Smith-Lemli–Opitz	↓ colesterol ↑ 7-dehidrocolesterol	• Keller <i>et al.</i> , 2004; <i>J Lipid Res.</i> 45:347-355. • Sharma <i>et al.</i> , 2021; <i>Traffic.</i> 22:332-344.
Niemann-Pick Tipo C	↓ colesterol ↑ colesterol en vesículas endolisosomales	• Garver <i>et al.</i> , 2000; <i>J Lipid Res.</i> 41:673-687. • Gowrishankar <i>et al.</i> , 2020; <i>Neurobiol Dis.</i> 146:105142.
Demencia con cuerpos de Lewy	↓ colesterol ↑ lisofosfatidilcolina ↑ ésteres de esteroides	• Marin <i>et al.</i> , 2016; <i>Neurobiol Aging.</i> 49:52-59.
Neuromielitis óptica	Relocalización de la proteína acuaporina-4 (AQP4)	• Asakura <i>et al.</i> , 2014; <i>Brain Res.</i> 1583:237-244.
Creutzfeldt-Jakob	Conversión de la proteína prion de su forma normal (PrP <sup>c</sup> ) a su forma infecciosa (PrP <sup>sc</sup> )	• Taylor and Hooper, 2006; <i>Mol Membr Biol.</i> 23:89–99.

de señalización mediada por receptores acoplados a proteínas  $G\alpha_s$ . En consistencia con lo anterior, se ha observado que el tratamiento crónico con fármacos antidepressivos (i. e., fluoxetina, desipramina y escitalopram) induce la relocalización de la subunidad  $G\alpha_s$  fuera de las balsas de membrana, propicia su mayor disponibilidad para activar la enzima adenilil ciclasa e incrementa la producción de AMPc [45,46]. La activación sostenida de esta vía de señalización se ha asociado también con un incremento en la proyección de neuritas [47]. La acción de estos fármacos antidepressivos parece ser específica para  $G\alpha_s$ , ya que no desplaza a ningún otro tipo de proteínas fuera de los *rafts*. Aun cuando el mecanismo implicado no está bien definido, se ha propuesto que estos antidepressivos se acumulan gradualmente en las balsas de membrana y que a partir de ello modulan la distribución de  $G\alpha_s$  y el funcionamiento de otras proteínas (i.e., receptores y canales iónicos) alojadas en estos nanodominios. La propuesta resulta novedosa dado que se considera a las propias balsas de membrana como los dominios de unión o blancos terapéuticos para los fármacos antidepressivos, propuesta que además de innovadora, explica la acción terapéutica tardía típicamente observada para estos fármacos.

### 7.2 Señalización por RTKs asociados a balsas de membrana: potencial blanco terapéutico en el cáncer

Numerosas evidencias respaldan que los niveles de colesterol intracelular tienden a estar elevados en diversos tipos de cáncer. Asimismo, se ha reportado que las células cancerosas presentan mayor número de balsas de membrana comparado con células normales. Diversas cascadas de señalización involucradas en el desarrollo, progresión y metástasis del cáncer se localizan en estos nanodominios, por lo tanto, constituyen potenciales blancos terapéuticos para tratar esta enfermedad [48]. Una de las cascadas

de señalización más estudiadas a este respecto es la del receptor para el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1R). Una vez activado, el IGF1R se une a las proteínas adaptadoras intracelulares IRS-1 e IRS-2 (del inglés *Insulin Receptor Substrate*) que sirven de andamiaje para el reclutamiento y activación de las vías de señalización PI3K-Akt y RAS-Raf-MAPK, las cuales están involucradas en la supervivencia y proliferación celular. El IGF1R y la proteína IRS-1 se localizan en balsas de membrana. En células progenitoras de oligodendrocitos, la disminución de los niveles de colesterol con metil- $\beta$ -ciclodextrina o con 25-hidroxicolesterol (un inhibidor de su síntesis) redujo la fosforilación de Akt mediada por IGF-1 y la supervivencia de estas células [49]. Además del IGF1R, otros receptores con actividad de cinasa de tirosina (e. g., EGFR, ErbB2 y PDGFR) activan la vía PI3K-Akt, una de las vías de señalización más frecuentemente activadas en el cáncer. Las balsas de membrana parecen ser esenciales en el desencadenamiento de la vía PI3K-Akt, al facilitar el reclutamiento de Akt tras la acumulación de PIP3 en la membrana plasmática. Se ha reportado que algunos compuestos pueden interferir con esta vía de señalización y tener un efecto antitumoral, tal es el caso de edelfosina (un alquilfosfolípido sintético), psicossina (galactosilesfingosina) y 10-gingerol (un lípido fenólico natural). Estos compuestos se intercalan en las balsas de membrana y las desestabilizan, afectando su señalización y llevando a las células a apoptosis [48, 50, 51]. La metástasis de las células tumorales requiere de ciertos procesos para llevarse a cabo, entre ellos la angiogénesis, por la cual se generan nuevos vasos sanguíneos. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es clave en este proceso. El receptor para este factor de crecimiento (VEGFR2) se aloja en *rafts*, siendo esta localización esencial en la señalización de los procesos angiogénicos mediados por VEGF [52]. Lo anterior identifica nuevamente a las balsas de membrana como blanco potencial para inhibir la angiogénesis y prevenir la metástasis del cáncer.

## 8. Conclusiones

- El modelo actual de la membrana plasmática contempla la interacción de sus componentes lipídicos y proteicos con elementos del citoesqueleto.
- La membrana plasmática presenta nanodominios estructurales denominados balsas de membrana.
- Las balsas de membrana constituyen plataformas en las que convergen los elementos de las vías de señalización asociadas a diversos procesos fisiológicos.
- Las condiciones al interior de las balsas de membrana modulan la transducción de señales.
- Diversos receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas y receptores con actividad de cinasa de tirosina se asocian a las balsas de membrana.
- Alteraciones en la estructura de las balsas de membrana desacomplan las vías de señalización asociadas a ellas.
- Afectaciones estructurales o funcionales de las balsas de membrana se relacionan con enfermedades neurológicas, inflamatorias y cáncer.
- Las balsas de membrana representan novedosos blancos terapéuticos.

## Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) a través de los convenios: CB-284443 (A.A.R.M.) y IFC-2016-1955 (A.A.R.-M. y U.M.) y por la Universidad Autónoma de San Luis Potosí a través de los convenios: C18-FRC-08-03.03 (A.A.R.M.) y C19-FAI-05-59.59 (U.M.).

## Referencias

[1] Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., Eggeling, C., The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18:361-374.

[2] Cheng, X., Smith, J. C., Biological membrane organization and cellular signaling. *Chem Rev* 2019; 119: 5849-5880.

[3] Kusumi, A., Fujiwara, T. K., Tsunoyama, T. A., Kasai, R. S., Liu, A. A., Hirose, K. M., Kinoshita, M., Matsumori, N., Komura, N., Ando, H., Suzuki, K. G. N., Defining raft domains in the plasma membrane. *Traffic* 2020; 21:106-137.

[4] Robertson, J. L., The lipid bilayer membrane and its protein constituents. *J Gen Physiol* 2018; 150:1472-1483.

[5] Singer, S. J., Nicolson, G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175:720-731.

[6] Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., *et al.* Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2005; 34:351-378.

[7] Chapman, D., Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Quart Rev Biophys* 1975; 8:185-235.

[8] Simons, K., van Meer, G., Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 1988; 27:6197-6202.

[9] Simons, K., Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 389:569-572.

[10] Pike, L. J., Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res* 2006; 47:1597-1598.

[11] Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., Rasenick, M. M., Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8:128-140.

[12] Alexander, S. P., Christopoulos, A., Davenport, A. P., *et al.*, The concise guide to pharmacology 2021/22: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 2021;178 Suppl 1:S27-S156.

[13] Chattopadhyay, A. GPCRs: Lipid-dependent membrane receptors that act as drug targets. *Advances in Biology* 2014; 2014:1-12.

[14] Weis, W. I., Kobilka, B. K., The molecular basis of G protein-coupled receptor activation. *Annu Rev Biochem* 2018; 87:897-919.

[15] Ostrom, R. S., Insel, P. A., The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol* 2004; 143:235-245

[16] Sarkar, P., Chattopadhyay, A. Cholesterol in GPCR structures: prevalence and relevance. *J Membr Biol* 2022; 255:99-106.

[17] Jafurulla, M., Aditya Kumar, G., Rao, B. D., Chattopadhyay, A., A critical analysis of molecular mechanisms underlying membrane cholesterol sensitivity of GPCRs. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1115:21-52.

[18] Jafurulla, M., Chattopadhyay, A., Membrane lipids in the function of serotonin and adrenergic receptors. *Current Medicinal Chemistry* 2013; 20:47-55.

[19] Hannon, J., Hoyer, D., Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 2008; 195:198-213.

[20] Pucadyil, T. J., Chattopadhyay, A., Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Prog Lipid Res* 2006; 45:295-333.

[21] Pucadyil, T. J., Chattopadhyay, A., Cholesterol modulates ligand binding and G-protein coupling to serotonin(1A) receptors from bovine hippocampus. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1663:188-200.

[22] Renner, U., Glebov, K., Lang, T., *et al.*, Localization of the mouse 5-hydroxytryptamine(1A) receptor in lipid microdomains depends on its palmitoylation and is involved in receptor-mediated signaling. *Mol Pharmacol* 2007; 72:502-513.

[23] Shrivastava, S., Pucadyil, T. J., Paila, Y. D., Ganguly, S., Chattopadhyay, A., Chronic cholesterol depletion using statin impairs the function and dynamics of human serotonin(1A) receptors. *Biochemistry* 2010; 49:5426-5435.

[24] Milligan, G., G protein-coupled receptor dimerisation: molecular basis and relevance to function. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768:825-835.

[25] Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Buergi, S., Draeger, A., The NK1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is dependent on lipid raft integrity. *J Biol Chem* 2005; 280:7135-7146.

[26] Licon, Y., Leandro, D., Romero-Mendez, C., Rodriguez-Menchaca, A. A., Sanchez-Armass, S., Meza, U., Inhibition of Ca<sub>v</sub>2.3 channels by NK<sub>1</sub> receptors is sensitive to membrane cholesterol

- but insensitive to caveolin-1. *Pflugers Arch* 2015; 467:1699-1709.
- [27] Paila, Y. D., Jindal, E., Goswami, S. K., Chattopadhyay, A., Cholesterol depletion enhances adrenergic signaling in cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808:461-465.
- [28] Prasanna, X., Chattopadhyay, A., Sengupta, D., Cholesterol modulates the dimer interface of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor via cholesterol occupancy sites. *Biophys J* 2014; 106:1290-1300.
- [29] Lemmon, M. A., Schlessinger, J., Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010; 141:1117-1134.
- [30] Pike, L. J., Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1746:260-273.
- [31] Mineo, C., James, G. L., Smart, E. J., Anderson, R. G., Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem*. 1996; 271:11930-11935.
- [32] Ringerike, T., Blystad, F. D., Levy, F. O., Madshus, I. H., Stang, E., Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *J Cell Sci*. 2002; 115:1331-1340.
- [33] Shostak, K., Chariot, A., EGFR and NF- $\kappa$ B: partners in cancer. *Trends Mol Med*. 2015; 21:385-393.
- [34] Zhang, G., Li, X., Chen, Q., *et al.* CD317 Activates EGFR by regulating its association with lipid rafts. *Cancer Res*. 2019; 79:2220-2231.
- [35] Oh, H. Y., Lee, E. J., Yoon, S., Chung, B. H., Cho, K. S., Hong, S. J., Cholesterol level of lipid raft microdomains regulates apoptotic cell death in prostate cancer cells through EGFR-mediated Akt and ERK signal transduction. *Prostate*. 2007; 67:1061-1069.
- [36] Ma, L., Huang, Y. Z., Pitcher, G. M., *et al.*, Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J Neurosci*. 2003; 23:3164-3175.
- [37] Yoshii, A., Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*. 2010; 70:304-322.
- [38] Suzuki, S., Numakawa, T., Shimazu, K., *et al.*, BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *J Cell Biol*. 2004; 167:1205-1215.
- [39] Huang, C. S., Zhou, J., Feng, A. K., *et al.*, Nerve growth factor signaling in caveolae-like domains at the plasma membrane. *J Biol Chem*. 1999; 274:36707-36714.
- [40] Limpert, A. S., Karlo, J. C., Landreth GE. Nerve growth factor stimulates the concentration of TrkA within lipid rafts and extracellular signal-regulated kinase activation through c-Cbl-associated protein. *Mol Cell Biol*. 2007; 27:5686-5698.
- [41] Tansey, M. G., Baloh, R. H., Milbrandt, J., Johnson, E. M., Jr. GFR $\alpha$ -mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron*. 2000; 25:611-623.
- [42] Paratcha, G., Ledda, F., Baars, L., *et al.*, Released GFR $\alpha$ 1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron*. 2001; 29:171-184.
- [43] Li, L., Song, H., Mu, P., *et al.*, The actin cytoskeleton is involved in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-induced ret translocation into lipid rafts in dopaminergic neuronal cells. *Int J Mol Sci*. 2017; 18:1922.
- [44] Donati, R. J., Dwivedi, Y., Roberts, R. C., Conley, R. R., Pandey, G. N., Rasenick, M. M., Postmortem brain tissue of depressed suicides increased G $\alpha_s$  localization in lipid raft domains where it is less likely to activate adenylyl cyclase. *J Neurosci*. 2008; 28:3042-3050.
- [45] Donati, R. J., Rasenick, M. M., Chronic antidepressant treatment prevents accumulation of G $\alpha_s$  in cholesterol-rich, cytoskeletal-associated, plasma membrane domains (lipid rafts). *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30:1238-1245.
- [46] Senese, N. B., Rasenick, M. M., Antidepressants produce persistent G $\alpha_s$ -associated signaling changes in lipid rafts after drug withdrawal. *Mol Pharmacol*. 2021; 100:66-81.
- [47] Yu, J. Z., Dave, R. H., Allen, J. A., Sarma, T., Rasenick, M. M., Cytosolic G $\alpha_s$  acts as an intracellular messenger to increase microtubule dynamics and promote neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 2009; 284:10462-1072
- [48] Mollinedo, F., Gajate, C., Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy. *J Lipid Res*. 2020; 61:611-635.
- [49] Romanelli, R. J., Mahajan, K. R., Fulmer, C. G., Wood, T. L., Insulin-like growth factor-I-stimulated Akt phosphorylation and oligodendrocyte progenitor cell survival require cholesterol-enriched membranes. *J Neurosci Res*. 2009; 87:3369-3377.
- [50] Ediriweera, M. K., Moon, J. Y., Nguyen, Y. T., Cho, S. K., 10-Gingerol targets lipid rafts associated PI3K/akt signaling in radio-resistant triple negative breast cancer cells. *Molecules*. 2020; 25:3164.
- [51] Li, B., Qin, Y., Yu, X., Xu, X., Yu, W., Lipid raft involvement in signal transduction in cancer cell survival, cell death and metastasis. *Cell Prolif*. 2022; 55: e13167.
- [52] Zabroski, I. O., Nugent, M. A., Lipid raft association stabilizes VEGF receptor 2 in endothelial cells. *Int J Mol Sci*. 2021; 22:798.

### ULISES MEZA

Doctor en Ciencias por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, cubrió una estancia posdoctoral en la Universidad de Iowa y es miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Es profesor investigador de tiempo completo en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí desde 1999, en donde trabaja en los proyectos: “Modulación de canales de calcio por receptores de la membrana plasmática”, “Caracterización funcional de mutaciones asociadas con enfermedades neurodegenerativas en canales de calcio activados por voltaje” e “Interacciones entre canales iónicos y lípidos en la membrana plasmática”.

### ALDO A. RODRÍGUEZ MENCHACA

Doctor en Ciencias por la Universidad de Colima, realizó una estancia posdoctoral en Virginia Commonwealth University y es miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Es profesor investigador de tiempo completo en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí desde 2010. Actualmente en su laboratorio se trabaja en los proyectos: “Modulación de canales de potasio por lípidos”, “Mecanismo de apertura/cierre de canales Kir4.1/Kir5.1” y “Farmacología de canales de potasio de rectificación entrante”.



Ulises Meza y Aldo A. Rodríguez Menchaca

# Remodelado vascular: nuevos conceptos sobre el papel de los canales de calcio regulados por los reservorios

Marta Martín-Bórnez,<sup>1,\*</sup> Elisa Bevilacqua,<sup>1,\*</sup> Débora Falcón<sup>1,2,\*</sup> y Tarik Smani<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla.

<sup>2</sup> Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla, 41009 Sevilla, España.

\* Igual contribución.

\* Autor de correspondencia:

Tarik Smani

Instituto de Biomedicina de Sevilla/Hospital Universitario Virgen del Rocío, Grupo de Fisiopatología Cardiovascular, Lab 113

Avenida Manuel Siurot s/n, Sevilla 41013, España.

Teléfono: (+34) 955 92 30 57; Fax: (+34) 955 92 31 01. Email: tasmani@us.es

**Resumen:** Las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la mayor causa de muerte en el mundo occidental. Uno de los componentes fisiopatológicos común a estas enfermedades es el remodelado celular, a lo que contribuyen los cambios en la expresión y la activación de canales iónicos críticos para la excitabilidad o el crecimiento. Las vías de señalización del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), en concreto a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por los reservorios intracelulares (SOCC por sus siglas en inglés), han surgido como importantes reguladores de células del músculo liso y del endotelio durante el proceso adaptativo de la remodelación celular. En esta revisión detallamos cómo la desregulación de componentes esenciales de la vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de SOCC contribuyen a la remodelación celular. Nos hemos centrado en destacar el papel de las diferentes variantes de Orai, subunidad que forma el canal SOCC, de STIM sensor del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del retículo sarcoplásmico, y de SARAF una nueva molécula reguladora tanto de STIM1 como de Orai1.

**Palabras clave:** Orai, STIM, SARAF, remodelado vascular.

## Abreviaturas

CAD	$\text{Ca}^{2+}$ -Release Activated Domain
CaMK	$\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (Ca <sup>2+</sup> -Calmodulina proteína cinasa)
CaN	Calcineurin (Calcineurina)
CMLV	Células del músculo liso vascular
CRAC	$\text{Ca}^{2+}$ -Release Activated Channel
CRAC2A	$\text{Ca}^{2+}$ -Release Activated Channel Regulator 2A
CREB	cAMP Response Element Binding
ECC	Entrada Capacitativa de $\text{Ca}^{2+}$
EFHB	EF-hand domain family member B
GPCR	G Protein-Coupled receptor (Receptor acoplado a proteína G)
IP <sub>3</sub> R	Receptor de 1,4,5-Trisfosfato de Inositol (Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor)
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells (Factor nuclear de células T activadas)
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)
OASF	Orai1-Activating Small Fragment
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)
RS	Retículo Sarcoplásmico
RYR	Receptor de Rianodina (Ryanodine Receptor)
SAM	Sterile Alpha Motif
SARAF	SOCE-associated regulatory factor
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (Inmunodeficiencia Combinada Severa)
SERCA	ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ del Reticulo Saco/Endoplasmático (Sarco/Endoplasmic Reticulum $\text{Ca}^{2+}$ ATPase)

SM-MHC	Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (Cadena pesada de la miosina de músculo liso)
SOAR	STIM-Orai1 Activating Region
SOCC	Store Operated $\text{Ca}^{2+}$ Channel (Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por los reservorios intracelulares)
SOCE	Store Operated $\text{Ca}^{2+}$ Entry (Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ regulada por reservorios)
STIM	Stromal Interaction Molecule
STIMATE	STIM-Activating Enhancer
αSMA	α-Smooth Muscle Actin (α-actina de músculo liso)

## 1. Sistema vascular

### 1.1. Estructura de la pared vascular

El sistema vascular permite el transporte y la distribución de los nutrientes necesarios a todas las células y tejidos del organismo. A la vez es capaz de eliminar los productos de desecho, garantizando el mantenimiento de la homeostasis. Para ello, los vasos sanguíneos se pueden organizar por las diferentes funciones que desempeñan. Por una parte, se encuentran los vasos encargados de la distribución de la sangre oxigenada desde el corazón hacia el resto del organismo formado por las arterias elásticas caracterizadas por ser vasos de gran calibre, capaces del transporte de sangre a alta presión y velocidad; las arterias musculares que se diferencian de las anteriores por tener una multicapa muscular y de calibre más pequeño; y las arteriolas de menor tamaño que permiten el control del flujo sanguíneo que llega a los tejidos. Además, están los capilares encargados del intercambio de sustancias necesarias a las células. Por otra parte, se pueden diferen-

ciar los vasos colectores encargados de devolver la sangre baja en  $O_2$  y nutrientes desde los tejidos hacia el corazón formados por las vénulas y las venas siendo estas últimas consideradas como un reservorio de sangre [1].

Aunque existan diferencias en los tipos de vasos sanguíneos y entre vasos de diferentes compartimentos y regiones del organismo, realmente todos los vasos tienen una estructura macro y microscópica común que se caracteriza por estar formados por tres capas o tunicas. Del lumen del vaso al exterior nos encontramos la túnica íntima, la media y la adventicia. Los diferentes vasos sanguíneos presentan variaciones en la proporción y el grosor de cada capa.

La túnica íntima es la capa que se encuentra en contacto con la sangre, encargada del intercambio de nutrientes. Se caracteriza por una monocapa semipermeable de células endoteliales (endotelio), la membrana basal, la capa de tejido conectivo que da soporte al endotelio, y la lámina elástica interna, que contiene una red de fibras de elastina [2]. La túnica media es la zona central con capacidad contráctil encargada de la vasoconstricción y la vasodilatación. Suele ser la capa de mayor grosor y está formada por células de músculo liso vascular (CMLV) y por fibras de elastina. Las capas de CMLV tienen una disposición concéntrica y son las responsables de generar fuerza mecánica y contráctil. Las fibras de elastina proporcionan distensibilidad, permitiendo al vaso estirarse frente a leves incrementos de presión. Juntas permiten el control del diámetro del lumen, de la presión arterial y del flujo sanguíneo [3]. Por último, la túnica adventicia que forma la parte más externa del vaso está compuesta por tejido conectivo y por una lámina elástica externa que la delimita de la capa media. Esta capa se caracteriza por dar soporte y por su heterogeneidad, ya que contiene fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos (*vasa vasorum*), nervios (*nervi vasorum*), células del sistema inmunitario, células progenitoras y tejido adiposo perivascular [4].

## 1.2 Función del músculo liso vascular

El músculo liso es el encargado de la vasoconstricción y vasodilatación sistémica. Este fenómeno fisiológico depende de la ultraestructura molecular y de la maquinaria contráctil [5]. Las CMLV tienen forma de huso y engloban la estructura que permite el movimiento, es decir, las proteínas contráctiles actina y miosina, con una proporción actina-miosina de 15:1. Estas proteínas se encuentran formando polímeros dando lugar a filamentos de actina (filamentos delgados) y filamentos de miosina (filamentos gruesos), responsables de desencadenar la contracción de las CMLV [6].

Los filamentos de actina presentan una estructura helicoidal resultado del enrollamiento de dos hebras de F-actina al que se le añaden también la tropomiosina y la calmodulina, esta última es una proteína reguladora sensible al calcio [7]. Por otra parte, los filamentos gruesos están formados por varias miosinas tipo II (molécula hexamérica de dos cadenas pesadas y cuatro ligeras) [8]. Cada hexámero se caracteriza por tres regiones: la cola que corresponde al extremo C-terminal de cada cadena pesada, el cuello, y la cabeza que corresponde al extremo N-terminal. La cabeza es el motor de la miosina ya que tiene actividad de ATPasa (miosina ATPasa), es decir, hidroliza ATP permitiéndole unirse a la actina.

Es en la zona intermedia, el cuello de la estructura, donde se ligan las cadenas ligeras [9]. En las CMLV también encontramos otros filamentos, los filamentos intermedios, cuyo principal componente es la vimentina y en menor proporción la desmina [10].

Los filamentos de la maquinaria contráctil no presentan organización en sarcómeros. Los filamentos de actina se unen a los cuerpos densos, agregados de  $\alpha$ -actinina, que les proporciona anclaje para la contracción [11]. Varias proteínas como  $\alpha$ -actinina, vinculina y actina componen las placas densas que son la unión entre los filamentos delgados y el citoesqueleto. Esto permite la transmisión de la fuerza de la maquinaria contráctil a la membrana y que estos estímulos mecánicos se puedan transmitir desde el exterior hacia el interior de la propia célula o entre células [5].

Las CMLV se contraen mediante el deslizamiento de los filamentos delgados de actina sobre los gruesos de miosina produciendo un acortamiento celular. El ion  $Ca^{2+}$  es el principal ejecutor en este proceso ya que un aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  libre intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) es el responsable de la contracción celular. En el músculo liso, el  $Ca^{2+}$  necesario para la contracción proviene tanto del medio extracelular como del retículo sarcoplásmico (RS) [12].

El aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular hace que el  $Ca^{2+}$  se una a la calmodulina y la active en una proporción 4:1, creando el complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina. Este activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina que directamente fosforila a la cadena ligera de la miosina y aumenta la actividad de la miosina ATPasa que permite formar los puentes cruzados entre actina y miosina. De esta manera se crea el acortamiento de la célula con la consecuente contracción muscular [13]. Así, las células musculares lisas mantienen el tono vascular y la presión sanguínea.

## 2. Remodelado vascular

Las CMLV en condiciones fisiológicas se encuentran en un estado quiescente y contráctil y juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la pared del vaso controlando el tono vascular. Sin embargo, presentan una gran plasticidad fenotípica que les permite contribuir al mantenimiento de la estructura vascular mediante su crecimiento, remodelado y reparación. Esta característica se manifiesta sobre todo en situaciones patológicas en las que se produce un cambio estructural llamado remodelado vascular. Los vasos sanguíneos pueden sufrir daños debido a diferentes estímulos ambientales como pueden ser factores de crecimiento, factores mitogénicos, inflamatorios y mecánicos [14]. De hecho, estos estímulos son los desencadenantes de algunas enfermedades como la aterosclerosis, la diabetes o la hipertensión [15]. Como consecuencia, se produce un cambio fenotípico en las CMLV, y pasan de un estado quiescente y contráctil a un estado proliferativo [16, 17]. Este cambio fenotípico se debe a la pérdida de la expresión de proteínas contráctiles como la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin), la cadena pesada de la miosina de músculo liso (SM-MHC, Smooth Muscle Myosin Heavy Chain) y la SM22 $\alpha$ , así como a la sobreexpresión de genes relacionados con el crecimiento celular, la proliferación, la migración y la síntesis de matriz extracelular

[18]. Este proceso se regula por alteraciones en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$ , que implica actividad y/o expresión de canales iónicos, bombas, enzimas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  [16] y factores de transcripción [19,20]. Como es el caso de la  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina proteína cinasa (CaMK, *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*), y de la calcineurina (CaN, *Calcineurin*), que activan diferentes rutas de señalización y estimulan diferentes factores de transcripción como el factor nuclear de células T activadas (NFAT, *Nuclear Factor of Activated T-cells*), Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB, *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y CREB (*cAMP Response Element Binding*), que regulan la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular [21].

El remodelado vascular es, por lo tanto, un cambio en la estructura y función de los vasos, así como una reorganización de los componentes celulares. En la mayoría de las enfermedades vasculares que cursan con remodelado vascular se produce un estrechamiento de la luz del vaso que puede incluso llegar a la obstrucción [15].

Para paliar esta obstrucción y recuperar un flujo sanguíneo adecuado se utiliza la angioplastia, uno de los métodos utilizados que mejor resultado ha dado. La angioplastia consiste en la introducción de un catéter con un balón inflable dirigido hacia la zona de obstrucción, donde el balón se infla para dilatar la arteria y con la ayuda de una malla sintética que se expande dentro del vaso (*stent*) se restablece el flujo sanguíneo manteniendo su apertura. Sin embargo, tras esta intervención en un porcentaje importante de pacientes se produce un nuevo estrechamiento de la luz del vaso o reestenosis debido a la proliferación de las CMLV, una de las principales limitaciones de la angioplastia. Hay un consenso que relaciona la reestenosis con la rotura de la placa aterosclerótica y daño endotelial provocada por esta intervención que da lugar a una respuesta inflamatoria caracterizada por una agregación y activación de plaquetas. En esta situación, las células endoteliales, que son las encargadas de secretar una serie de factores, así como el óxido nítrico para mantener la integridad del vaso y preservar el estado quiescente de las CMLV, liberan citoquinas y factores de crecimiento, provocando la proliferación de CMLV, que migran hacia la capa íntima de la pared arterial y forman una nueva íntima conocida como neoíntima, formada principalmente por CMLV, lo que ocasiona la reestenosis coronaria [22, 23].

El cambio fenotípico de las CMLV afecta a la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$ , debido a que se produce una disminución de la expresión de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y un aumento de expresión de unos canales catiónicos regulados por los reservorios, conocidos como SOCE por las siglas en inglés de *Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry* [16, 24]. La activación de SOCE es un proceso clave en el cambio fenotípico de las CMLV hacia un fenotipo proliferativo y migratorio y por ello en el remodelado y reestenosis vascular [25].

### 3. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ regulados por los reservorios en las células de músculo liso

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero que puede activar la transcripción génica y un ion crucial en numerosos procesos celulares

como la excitación, proliferación y contracción. Por este motivo, la célula necesita regular los niveles de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  puede deberse a una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde exterior al interior celular a través de canales de la membrana plasmática, incluyendo los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes, y/o a una salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios celulares, como el RS, hacia el citoplasma a través del receptor de rianodina (RYR, *Ryanodine Receptor*) o del receptor de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP3R, *Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor*), situados en la membrana del RS. El reestablecimiento de los niveles de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  para mantener la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ocurre gracias a bombas e intercambiadores de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática que permiten que el  $\text{Ca}^{2+}$  sea expulsado al exterior celular y bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  en los orgánulos que permiten que sea recaptado a los reservorios.

En 1977, Putney observó una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular tras una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular [26], pero no fue hasta 1986 cuando propuso la teoría de la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  (ECC), en la que consideraba que el vaciado de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios ocasionaba una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular para restaurar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de los mismos [27]. En esta misma línea, en 1989 Takemura y cols [28] observaron un incremento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en células acinares de la parótida, tras estimularse un vaciado del RS usando la Tapsigargina, el inhibidor de la bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo saco/endoplasmático (SERCA, *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase*). Actualmente, se le aplica el término de SOCE al proceso de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del exterior celular como consecuencia de vaciado de los reservorios intracelulares y SOCC canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por los reservorios intracelulares (SOCC, *Store Operated Ca<sup>2+</sup> Channel*) a los canales a través de los cuales se produce esta entrada extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los principales componentes moleculares de SOCE son: las proteínas STIM1 y 2 (*Stromal Interaction Molecule*) que se encuentra en la membrana del RS y actúan como sensores de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del RS; y las 3 isoformas de Orai, subunidades formadoras del poro selectivo a  $\text{Ca}^{2+}$  de los SOCCs. El mecanismo de activación de SOCE se debe a que STIM1 interacciona con Orai1 en la membrana plasmática activando el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula.

Aunque SOCE juega un papel fundamental en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células no excitables, SOCE también se ha estudiado en células excitables como en CMLV presentando el mismo mecanismo de activación [29]. En estas células, SOCE es esencial, ya que interviene en el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y también participa en procesos fisiológicos como la regulación del tono vascular, la vasculogénesis y la proliferación, y en procesos patológicos vasculares como la reestenosis [30].

### 3.1. Componentes moleculares de SOCE

#### 3.1.1. STIM1

La proteína STIM fue descubierta en un análisis de proteínas de transmembrana y proteínas secretadas de células estromales que se unen a los linfocitos pre-B. Los mamíferos expresan dos proteínas homólogas, STIM1 y STIM2. STIM1 es una proteína de membrana (~685 aminoácidos) del RS de un único segmen-

to transmembrana que posee numerosos dominios estructurales, con un extremo N-terminal localizado en el lumen del RS en el que se encuentran un dominio "EF hand" de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y un dominio SAM (*Sterile Alpha Motif*), este último implicado en la interacción proteína-proteína. El extremo C-terminal, localizado en el citosol contiene 3 dominios "coiled-coil" (CC1, CC2 y CC3), una región rica en lisina que interacciona con fosfolípidos de la membrana y una región de interacción con microtúbulos. Los dominios CC2 y CC3 representan la región SOAR (*STIM-Orai1 Activating Region*)/dominio CAD (*Ca<sup>2+</sup>-Release Activated Domain*). El dominio CC1 representa un haz de tres hélices estabilizado por contactos interhelicoidales, siendo la tercera una hélice inhibidora que bloquea la región SOAR/CAD [31], que es la mínima región necesaria para la activación de Orai1, dentro del fragmento OASF (*Orai1-Activating Small Fragment*) [32].

Por otra parte, se ha demostrado la presencia de STIM1 en la membrana plasmática con el extremo N-terminal dirigido al exterior celular y el dominio C-terminal localizado en el interior celular [33]. Este STIM1 es fundamental para la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por ácido araquidónico (ARC) [34].

### 3.1.2. Orai

A principio de los años noventa se detectaron varios pacientes con inmunodeficiencia combinada severa (SCID, *Severe Combined Immunodeficiency*) que presentaban una deficiencia en la función de los canales CRAC (*Ca<sup>2+</sup>-Release Activated Channel*). En 2006 se relacionó esta deficiencia con una mutación en una molécula llamada Orai1 [35]. Orai es un canal iónico que presenta tres genes homólogos en mamíferos: Orai1, Orai2 y Orai3, y que presenta poca similitud en la secuencia con otros canales iónicos. Orai1 es el mejor caracterizado, siendo el principal componente de los SOCCs. Orai1 permite una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  selectiva para este ion y, además, está implicado en distintas enfermedades.

Orai1 posee cuatro dominios transmembrana (TM1-TM4) y puede sufrir numerosas modificaciones postraduccionales, principalmente, glicosilación y fosforilación. Orai1 puede formar canales homoméricos o heteroméricos. En el segmento TM1, se encuentran el poro y filtro de selectividad, formado por residuos de glutamato, haciéndolo altamente selectivo para el  $\text{Ca}^{2+}$ . En lado citosólico se encuentran los extremos N- y C-terminal, donde se encuentran regiones de interacción con STIM1, PKC y la calmodulina [36, 37]. Orai1 interacciona con el dominio CAD de STIM1 a través de unos residuos hidrofóbicos y ácidos presentes en el extremo C-terminal de Orai1 [38].

Mediante estudios de cristalografía y análisis de secuencias se ha determinado que los SOCCs formados por Orai1 están constituidos por seis subunidades (estructura hexamérica). Sin embargo, Orai1 puede formar canales heteropentaméricos con tres subunidades de Orai1 y dos subunidades de Orai2 para generar ARC [39]. Por tanto, Orai1 podría participar en tres canales distintos de  $\text{Ca}^{2+}$ : CRAC (Orai1 es activado por STIM1), SOCCs no selectivos (canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por reservorios donde hay una interacción entre Orai1, STIM1 y proteínas TRPC); y los canales ARC.

Recientemente, se ha descrito que el gen humano de Orai1 tiene una longitud de 16128 Kb, está localizado en el cromosoma

12q24.31 y presenta dos isoformas proteicas: Orai1 $\alpha$  (~33 KDa) y Orai1 $\beta$  (~23 KDa) debido a la existencia de dos sitios de inicio de traducción diferentes. Ambos dan lugar a canales CRAC funcionales y su localización celular es similar. Sin embargo, Orai1 $\beta$  presenta una mayor movilidad en la membrana plasmática y carece de los aminoácidos 1 al 63. Orai1 $\alpha$  presenta una mayor inactivación rápida dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  sugiriendo que los 63 aminoácidos del extremo N-terminal podrían jugar un papel fundamental en este proceso [40].

### 3.1.3. SARAF y otros componentes de SOCE

La proteína SARAF (*SOCE-associated regulatory factor*) identificada en 2012 y conocida como TMEM66, tiene un papel emergente en la regulación de SOCE. La proteína SARAF humana es un péptido de 339 aminoácidos codificada por el gen SARAF que posee siete exones y está localizado en el cromosoma 8p12. SARAF en los vertebrados está altamente conservada, y en mamíferos está expresada de manera ubicua, presentando una expresión muy elevada en los tejidos inmune y neuronal [41]. Se localiza principalmente en la membrana del RS, aunque también en la membrana plasmática. Es una proteína de un dominio transmembrana con un extremo C-terminal citosólico y un extremo N-terminal localizado en el lumen del RS, que regula su actividad. Estudios electrofisiológicos y de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$  demostraron que SARAF facilita la inactivación lenta dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de los canales CRAC mediante su interacción con STIM1.

A través de co-inmunoprecipitación se demostró que el extremo C-terminal de SARAF es la región necesaria para su interacción con la región SOAR de STIM1 en el citosol. En condiciones basales, en las que hay  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS, SARAF se une a STIM1 impidiendo la interacción con Orai1 y evitando la activación de SOCE. Por otro lado, SARAF estaría implicada en la activación de SOCE ya que cuando se produce una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares, SARAF se disocia de STIM1 y se transloca a la membrana para interactuar con Orai1-STIM1 y permitir la activación de SOCE, aunque rápidamente se disocia de Orai1 para volver a unirse a STIM1 cuando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS vuelven a su estado basal [42, 43]. A pesar de conocerse este mecanismo modulador de SARAF, los detalles de la función reguladora de SOCE, especialmente en CMLV proliferativas, aún se desconocen.

Además, hay otras proteínas que regulan SOCE como CRAR2A (*Ca<sup>2+</sup>-Release Activated Channel Regulator 2A*), que es un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol que estabiliza el complejo STIM1-Orai1 [33]; la proteína STIMATE (*STIM-Activating Enhancer*), un regulador de la activación de STIM1 [44], HOMER que media la interacción entre STIM1 y Orai1 [45] y entre STIM1 y Cav1.2 [46] 2, y EFHB (*EF-hand domain family member B*, también conocida como CFAP21) un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que modula la interacción STIM1-SARAF [47].

### 3.2. Mecanismos de activación

El descubrimiento de inhibidores de SERCA y el método de la readición de  $Ca^{2+}$  permitieron estudiar SOCE [48]. Este método consiste en producir el vaciado de los reservorios en una solución sin  $Ca^{2+}$  extracelular usando un inhibidor de SERCA (Tapsigargina es el más utilizado) [49], que provoca un aumento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$ , debido al vaciado de las reservas de  $Ca^{2+}$  del RS. Posteriormente, los niveles de  $Ca^{2+}$  citoplasmáticos vuelven a su estado basal debido a la salida de  $Ca^{2+}$  al exterior celular. La readición de  $Ca^{2+}$  a la solución extracelular provoca una entrada de  $Ca^{2+}$  al interior celular a través de los canales SOCC manteniendo los niveles de  $Ca^{2+}$  citoplasmáticos altos. Esta señal de entrada de  $Ca^{2+}$  no se produce en células con los reservorios intactos demostrando que la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular era debida al vaciado del RS. Estos descubrimientos sugirieron la existencia de una importante dinámica celular y una intercomunicación intermembrana [50].

Hoy en día hay un consenso sobre el mecanismo de activación de SOCE que se resume de la siguiente manera: la depleción de  $Ca^{2+}$  del reservorio se detecta por el dominio "EF hand" produciendo la oligomerización de la proteína STIM1 y la exposición de su dominio de activación SOAR/CAD de su extremo C-terminal con la que interacciona Orai1 desencadenando la apertura del canal y la consecuente entrada de  $Ca^{2+}$  a favor del gradiente químico [51].

### 4. Papel de SOCE en la proliferación de CMLV y restenosis

En CMLV sintéticas o proliferativas se ha observado un aumento de SOCE, así como una sobreexpresión de Orai1 y STIM1 en comparación con CMLV quiescentes como viene indicado en la Figura 1.

Además, un *knockdown* de estas dos proteínas inhibe la proliferación y migración de las CMLV [18, 24, 52]. Orai2 y Orai3 también se encuentran sobreexpresados durante el remodelado de las CMLV [53]. Por otro lado, STIM1 está implicado en la proliferación de las CMLV, en parte a través de la fosforilación de CREB [24].

En concreto, se ha demostrado un aumento de Orai1 y STIM1 en células de músculo liso aisladas de carótidas procedentes de un modelo de angioplastia [54]. En este mismo modelo, Orai1 presentó una expresión máxima a los catorce días después de la angioplastia y su inhibición mediante un lentivirus shOrai1 disminuyó tanto la proliferación de CMLV como la formación de la neoíntima [25]. Lo mismo ocurre con STIM1 [25, 55] por lo que es evidente una relación directa entre la proliferación de las CMLV, la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de SOCE y, en definitiva, el proceso de remodelado vascular durante la reestenosis. De hecho, incluso en el ámbito clínico se ha demostrado un aumento de STIM1 en suero de pacientes restenosados tras una angioplastia que se correlaciona con la aparición de reestenosis [56].

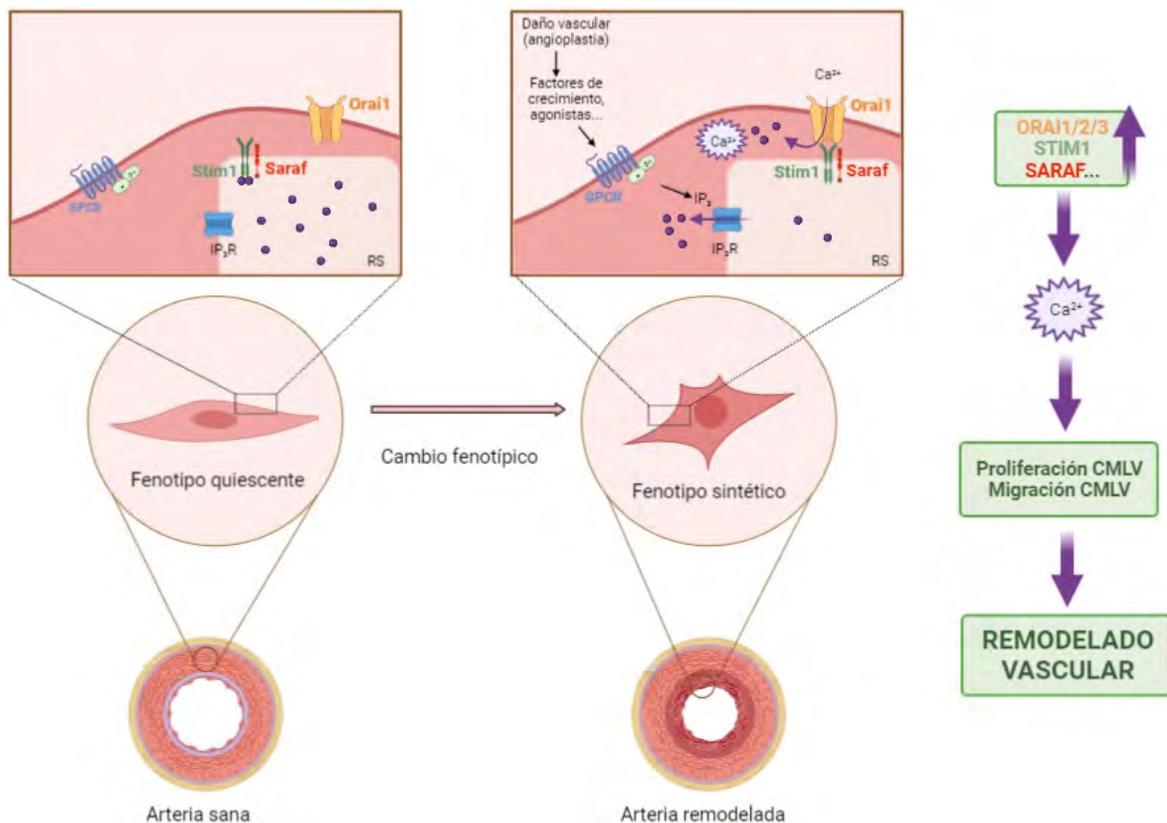


Figura 1. La imagen indica que los trastornos vasculares dependen de la activación de la vía de señalización SOCE en las células del músculo liso vascular, o de cambios críticos en la expresión de proteínas Orai1/2/3, STIM1 y SARAF.

Por otro lado, podemos destacar el papel de STIM1 y Orai1 en el efecto del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelet-Derived Growth Factor*), un factor sérico pro-migratorio y pro-proliferativo, que actúa sobre las CMLV. Se ha demostrado que el PDGF activa la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de SOCE mediada por STIM1 y Orai1 [54], y el desarrollo de enfermedades vasculares [57]. PDGF activa la corriente CRAC clásica dependiente de los reservorios mediante Orai1 mientras que la trombina activa al canal formado por Orai1 y Orai3, una vía independiente de reservorios que requiere leucotrieno  $C_4$  (LTC<sub>4</sub>) aunque también la participación de STIM1. La unión de la trombina a su receptor provoca en último término la síntesis del LTC<sub>4</sub> citosólico mediante la leucotrieno  $C_4$  sintasa [53].

En el caso de la reestenosis vascular, en un modelo de angioplastia carotídea, estas corrientes mediadas por Orai3 en las CMLV, están sobrerreguladas y un *knockdown* de Orai3 mediante un lentivirus shRNA inhibe estas corrientes, así como el remodelado de las CMLV y la formación de la neointima, demostrando la implicación de Orai3 [53].

En el caso de SARAF, existen algunas evidencias de su papel en el remodelado vascular. Se ha observado una disminución de SARAF en la neointima de arterias carotídeas procedentes de un modelo de rata de angioplastia, en comparación con las arterias controles. Además, un aumento de SARAF, mediante un lentivirus, disminuye la neointima en estas carótidas. Por otro lado, en cultivos celulares la sobreexpresión de SARAF atenúa la entrada de  $Ca^{2+}$  estimulada por PDGF, y la proliferación y migración de CMLV aórticas. Por ello, se plantea que SARAF puede llevar a cabo un papel protector en el proceso de remodelado vascular que se produce en la reestenosis [58]. Sin embargo, aún no queda completamente clara la interacción entre SARAF y el complejo Orai1-STIM1 ni la relación de activación o inactivación de la vía de señalización.

Otra proteína relacionada con SOCE e implicada en la reestenosis es HOMER1. Esta es una proteína de andamiaje que se une al complejo de proteínas SOCC. Aunque aún no se conoce muy bien su papel en las CMLV, esta proteína también se encuentra sobreexpresada en carótidas lesionadas procedentes de un modelo de rata de angioplastia. Su *knockdown* reduce tanto SOCE como la proliferación y la migración de las CMLV, así como el grosor de la neointima de estas arterias, sugiriendo ser otro componente clave en la reestenosis [59].

Es por ello, que tanto Orai1, como STIM1 y SARAF pueden sugerirse como dianas terapéuticas para disminuir el remodelado vascular y la reestenosis. Es importante destacar que, en la clínica, actualmente, se utilizan *stents* fármaco-activos que tienen sirolimus como antiproliferativo que se ha demostrado capaz de inhibir SOCE [60].

## 5. Conclusiones

En los últimos años se ha empezado a comprender el papel que desempeña la vía de señalización SOCE en varios tipos de células implicadas en las enfermedades cardiovasculares. Los estudios realizados en células aisladas, incluidas las células musculares lisas

y endoteliales, han sido útiles para comprender la contribución de los canales Orai y las proteínas que les regulan, a la señalización de  $Ca^{2+}$  en respuesta a diversos agonistas de receptores. Gran parte de los trabajos anteriores se han centrado en la isoforma canónica Orai1, por ello los estudios futuros deberán diseccionar la contribución de otras isoformas, incluyendo Orai2, Orai3 y Orai1 $\beta$ . Esto incluye su capacidad de heteromultimerización y de estar sujetos a modificaciones post-traduccionales. La contribución de las distintas isoformas de Orai, STIM y eventualmente SARAF al remodelado vascular podría dar esperanzas de que sean objeto de un tratamiento específico para ciertas patologías relacionadas con el remodelado vascular.

## Agradecimientos

El grupo de investigación está co-financiado por el proyecto de la Agencia Española de Investigación [PID2019-104084GB-C22/AEI/10.13039/501100011033]; y por los fondos FEDER [US-1381135].

## Referencias

- [1] Ratz, P. H., Vascular structure and function. Vascular smooth muscle: structure and function in health and disease, *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*; 2016, p. 47–144.
- [2] Levick, J. R., Levick, J. R., Chapter 10 – Vascular smooth muscle. *An Introduction to Cardiovascular Physiology* 1991:171–7.
- [3] Katz, A. M., Molecular and Cellular Basis of Contraction and Relaxation. *Atlas of HEART FAILURE* 2005:1–14.
- [4] Cabrera Fischer, E. I., La adventicia: estado actual del conocimiento. *Rev Argent Cardiol* 2008; 76:58–63.
- [5] Ye, G. J. C., Nesmith, A. P., Parker, K. K., The role of mechanotransduction on vascular smooth muscle myocytes' [corrected] cytoskeleton and contractile function. *Anat Rec (Hoboken)* 2014; 297: 1758–69.
- [6] Stromer, M. H., Bendayan, M., Arrangement of desmin intermediate filaments in smooth muscle cells as shown by high-resolution immunocytochemistry. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988; 11:117–25.
- [7] Biochemistry of skeletal, cardiac, and smooth muscle - The Medical Biochemistry Page n.d. <https://themedicalbiochemistry-page.org/biochemistry-of-skeletal-cardiac-and-smooth-muscle/>
- [8] Eddinger TJ, Meer DP. Myosin II isoforms in smooth muscle: Heterogeneity and function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293:493–508.
- [9] Sellers, J. R., Eisenberg, E., Adelstein, R. S., The binding of smooth muscle heavy meromyosin to actin in the presence of ATP. Effect of phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 1982; 257:13880–3.
- [10] Tang, D. D., INTERMEDIATE FILAMENTS IN SMOOTH MUSCLE. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294:C869.
- [11] Aguilar, H. N., Mitchell BF. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update* 2010; 16:725–44.

- [12] Sanders, K. M., Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* (1985) 2001; 91:1438–49.
- [13] Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003; 83:1325–58.
- [14] Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z., Michel, J. B., The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* 2012; 95:194–204.
- [15] Pasterkamp, G., De Kleijn, D. P. V., Borst C. Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. *Cardiovasc Res* 2000; 45:843–52.
- [16] House, S. J., Potier, M., Bisailon, J., Singer, H. A., Trebak, M., The non-excitable smooth muscle: Calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch* 2008; 456:769–85.
- [17] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004; 84:767–801.
- [18] Shower, H., Norman, K., Cheng, C. W., Foster, R., Beech, D. J., Bailey, M. A., Orai1 Ca<sup>2+</sup> Channel as a therapeutic target in pathological vascular remodelling. *Front Cell Dev Biol* 2021;9.
- [19] Matchkov, V. V., Kudryavtseva, O., Aalkjaer, C., Intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling and phenotype of vascular smooth muscle cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 110:42–8.
- [20] Kudryavtseva, O., Aalkjær, C., Matchkov, V. V., Vascular smooth muscle cell phenotype is defined by Ca<sup>2+</sup>-dependent transcription factors. *FEBS J* 2013; 280:5488–99.
- [21] Humeau, J., Bravo-San, Pedro J. M., Vitale, I., Nuñez, L., Villalobos, C., Kroemer, G., *et al.* Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell Calcium* 2018; 70:3–15.
- [22] Wassif, H., Welt, F. G. P., Restenosis. StatPearls Publishing; 2021.
- [23] Kipshidze, N., Dargas, G., Tsapenko, M., Moses, J., Leon, M. B., Kutryk, M., *et al.* Role of the endothelium in modulating neointimal formation: Vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:733–9.
- [24] Potier, M., Gonzalez, J. C., Motiani, R.K., Abdullaev, I. F., Bisailon, J. M., Singer, H. A., *et al.* Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *The FASEB Journal* 2009; 23:2425.
- [25] Zhang, W., Halligan, K. E., Zhang, X., Bisailon, J. M., Gonzalez-Cobos, J. C., Motiani, R. K., *et al.* Orai1-mediated I (CRAC) is essential for neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 2011; 109: 534–42.
- [26] Putney, J. W., Jr. Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland. *J Physiol* 1977; 268:139.
- [27] Putney, J. W., A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986; 7:1–12.
- [28] Takemura, H., Hughes, A. R., Thastrup, O., Putney, J. W., Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells: evidence that an intracellular calcium pool, and not an inositol phosphate, regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264:12266–71.
- [29] Leung, F. P., Yung, L. M., Yao, X., Laher, I., Huang, Y., Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2008; 153:846.
- [30] Avila-Medina, J., Mayoral-Gonzalez, I., Dominguez-Rodriguez, A., Gallardo-Castillo, I., Ribas, J., Ordoñez, A., *et al.* The complex role of store operated calcium entry pathways and related proteins in the function of cardiac, skeletal and vascular smooth muscle cells. *Front Physiol* 2018;9:257.
- [31] Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y. J., Worley, P. F., Muallem, S., SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol* 2009; 11:337–43.
- [32] Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., *et al.* A Cytosolic Homomerization and a modulatory domain within STIM1 C terminus determine coupling to Orai1 Channels. *J Biol Chem* 2009; 284:8421.
- [33] Srikanth, S., Jung, H. J., Kim, K. Do., Souda, P., Whitelegge, J., Gwack, Y. A., novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca<sup>2+</sup> sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nat Cell Biol* 2010;12:436.
- [34] Shuttleworth, TJ, Thompson JL, Mignen O. STIM1 and the noncapacitative ARC channels. *Cell Calcium* 2007; 42:183–91.
- [35] Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., *et al.* A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006; 441:179–85.
- [36] Hooper, R., Zhang, X., Webster, M., Go, C., Kedra, J., Marchbank, K., *et al.* Novel Protein Kinase C-Mediated Control of Orai1 Function in Invasive Melanoma. *Mol Cell Biol* 2015; 35:2790–8.
- [37] Mullins, F. M., Yen, M., Lewis, R. S., Orai1 pore residues control CRAC channel inactivation independently of calmodulin. *J Gen Physiol* 2016; 147:137–52.
- [38] Cai, X., Molecular evolution and structural analysis of the Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel subunit, Orai. *J Mol Biol* 2007; 368:1284–91.
- [39] Desai, P. N., Zhang, X., Wu, S., Janoshazi, A., Bolimuntha, S., Putney, J. W., *et al.* Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message. *Sci Signal* 2015;8.
- [40] Sanchez-Collado, J., Lopez, J. J., Jardin, I., Camello, P. J., Falcon, D., Regodon, S., *et al.* Adenylyl cyclase type 8 overexpression impairs phosphorylation-dependent orai1 inactivation and promotes migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancers (Basel)* 2019;11.
- [41] Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., Reuveny, E., SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell* 2012;149:425–38.
- [42] Albarran, L., Lopez, J. J., Amor, N. Ben., Martin-Cano, F. E., Berna-Erro, A., Smani, T., *et al.* Dynamic interaction of SARAF with STIM1 and Orai1 to modulate store-operated calcium entry. *Sci Rep* 2016;6.
- [43] Jardín, I., Albarran, L., Salido, G. M., López, J. J., Sage, S. O., Rosado, J. A., Fine-tuning of store-operated calcium entry by fast and slow Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation: Involvement of SARAF. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018; 1865:463–9.

- [44] Jing, J., He, L., Sun, A., Quintana, A., Ding, Y., Ma, G., *et al.* Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca<sup>2+</sup> influx. *Nat Cell Biol* 2015; 17:1339–47.
- [45] Jardin, I., Albarrán, L., Bermejo, N., Salido, G. M., Rosado, J. A., Homers regulate calcium entry and aggregation in human platelets: a role for Homers in the association between STIM1 and Orai1. *Biochem J* 2012; 445:29–38.
- [46] Dionisio, N., Smani, T., Woodard, G. E., Castellano, A., Salido, G. M., Rosado, J. A., Homer proteins mediate the interaction between STIM1 and Cav1.2 channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2015; 1853:1145–53.
- [47] Albarran, L., Lopez, J. J., Jardin, I., Sanchez-Collado, J., Berna-Erro, A., Smani, T., *et al.* EFHB is a novel cytosolic Ca<sup>2+</sup> Sensor that modulates STIM1-SARAF interaction. *Cell Physiol Biochem* 2018; 51:1164–78.
- [48] Bird, G. S., DeHaven, W. I., Smyth, J. T., Putney, J. W., Methods for Studying Store-Operated Calcium Entry. *Methods* 2008; 46:204.
- [49] Thastrup, O., Dawson, A. P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P. J., Drøbak, B. K., *et al.* Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 1989; 27:17–23.
- [50] Lu, B., Fivaz, M., Neuronal SOCE: myth or reality? *Trends Cell Biol* 2016; 26:890–3.
- [51] Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., *et al.* STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* 2005; 169: 435–45.
- [52] Potier, M., Trebak, M., New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway. *Pflugers Arch* 2008; 457:405–15.
- [53] Gonzalez-Cobos, J. C., Zhang, X., Zhang, W., Ruhle, B., Motiani, R. K., Schindl, R., *et al.* Store-independent Orai1/3 channels activated by intracrine leukotriene C4: role in neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2013; 112:1013–25.
- [54] Bisailon, J. M., Motiani, R. K., Gonzalez-Cobos, J. C., Potier, M., Halligan, K. E., Alzawahra, W. F., *et al.* Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298.
- [55] Guo, R. W., Wang, H., Gao, P., Li, M. Q., Zeng, C. Y., Yu, Y., *et al.* An essential role for stromal interaction molecule 1 in neointima formation following arterial injury. *Cardiovasc Res* 2009; 81:660–8.
- [56] Li, H., Jiang, Z., Liu, X., Yang, Z., Higher plasma level of STIM1, OPG are correlated with stent restenosis after PCI. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8:21089.
- [57] Raines, E. W., PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15:237–54.
- [58] Yang, J., Li, S., Wang, Q., Yang, D., Transmembrane protein 66 attenuates neointimal hyperplasia after carotid artery injury by SOCE inactivation. *Mol Med Rep* 2019; 20:1436–42.
- [59] Jia, S., Rodriguez, M., Williams, A. G., Yuan, J. P., Homer binds to Orai1 and TRPC channels in the neointima and regulates vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Sci Rep* 2017; 7.
- [60] König, S., Browne, S., Doleschal, B., Scherthaner, M., Poteser, M., Mächler, H., *et al.* Inhibition of Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup> entry is a key mechanism of the antiproliferative action of sirolimus in human arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305:1646–57.

### TARIK SMANI HAJAMI

Es doctor en Biología por la Universidad de Sevilla, profesor titular de la Universidad en el departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla, e Investigador responsable del grupo de Fisiopatología Cardiovascular en el Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Virgen del Rocío, en España. Su carrera científica comenzó en 1995, como becario predoctoral del doctor José López Barneo cuya supervisión, al igual que la del doctor Juan Ureña López, le sirvió para desarrollar y defender su tesis doctoral, titulada *Homeostasis del calcio en miocitos del árbol arterial pulmonar*, en Sevilla en el 2000. Posteriormente, desarrolló una estancia postdoctoral de cuatro años en el grupo de la doctora Victoria Bolotina en la Unidad de Biología Vascular de la “Whitaker Cardiovascular Institute” de la Universidad de Boston en Estados Unidos. Los resultados de esa etapa tuvieron mucha aceptación y una alta repercusión ya que determinó un nuevo mecanismo de regulación de un canal iónico, que fue publicado en revistas de alto índice de impacto (como *Nature Cell Biology*, *JBC*, y *Molecular Pharmacology*). A final del 2004, el doctor Smani obtuvo un contrato de Investigador Ramón y Cajal, seguido por el programa I3, que le sirvió para formar un grupo de investigación mixto con el doctor Antonio Ordoñez, jefe de servicio de Cirugía Cardíaca en aquel tiempo. Actualmente, el grupo del doctor Smani forma parte del Instituto de Biomedicina de Sevilla donde es Investigador Responsable (IR), estudiando el papel fisiopatológico de la entrada capacitativa en el sistema cardiovascular. Asimismo, el doctor Smani desarrolla nuevas líneas de investigación relacionadas con la protección cardíaca y el remodelado cardiovascular. Últimamente, su grupo está muy interesado en el remodelado de la homeostasis de calcio en relación con el remodelado vascular y angiogénesis. El doctor Smani cuenta con más de 70 artículos científicos, citados más de 1695 veces según Scopus, de los cuales 13 están publicados en revistas de primer decil y otros 33 en el primer cuartil de su área de conocimiento. Su índice H es 23.





# La importancia de la bomba SERCA en la regulación del calcio intracelular en los miocitos lisos vasculares en condiciones fisiológicas y patológicas

Cristian Julian Arriero-Carrillo, Rogelio Salazar-Enciso y Angélica Rueda\*  
Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

\* Autor para correspondencia:

Angélica Rueda, PhD.

Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN

Av. IPN 2508. Col. San Pedro Zacatenco

Ciudad de México, 07360, México

Teléfono: +52 (55) 5747-3953

E-mail: arueda@cinvestav.mx

**Resumen:** El ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es un mensajero intracelular fundamental que participa en la transducción de diversas señales celulares. Los incrementos transitorios de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) participan en una gran variedad de funciones celulares, entre ellas, la contracción de las células de músculo liso vascular o miocitos lisos vasculares (MLVs), los cuales forman parte de los vasos sanguíneos. En la regulación dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los MLVs participa la bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico (RS/RE) o bomba SERCA. Esta proteína transmembranal pertenece a la familia de ATPasas del tipo P (por su capacidad de auto-fosforilarse en el residuo de ácido aspártico 351) y usa la energía de la hidrólisis del ATP para transportar el  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma hacia sus reservorios intracelulares, localizados principalmente en el RS de los MLVs, por lo que participa activamente en disminuir la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , para favorecer la vaso-relajación y, en consecuencia, regular el diámetro arterial. Se han identificado tres genes en mamíferos (*ATP2A1-3*) que codifican a las 12 isoformas de la bomba SERCA identificadas hasta el momento, las cuales se originan principalmente por mecanismos de edición alternativa del mRNA (*splicing*) y se expresan de manera tejido-específica. Particularmente, en los MLVs de arterias como la aorta y mesentéricas se ha reportado la expresión de las isoformas SERCA2a, SERCA2b y recientemente de SERCA3. En este capítulo, revisamos la estructura, mecanismo de acción y participación de la bomba SERCA en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los MLVs de arterias de resistencia en condiciones fisiológicas y en algunas patologías vasculares que se han exacerbado en la era post-COVID.

**Palabras clave:** Bomba SERCA, músculo liso vascular, chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, receptor de rianodina.

## Abreviaturas

aa's	aminoácidos
$\text{BK}_{\text{Ca}}$	canales de $\text{K}^+$ de alta conductancia dependientes de $\text{Ca}^{2+}$ y voltaje
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$	concentración de $\text{Ca}^{2+}$ libre en el citoplasma
CaM	calmodulina
CML	células de músculo liso
DAG	diacilglicerol
DM1	diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
FKBP	proteínas de la familia de inmunofilinas
GPCR	receptores de 7 pasas transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas
$\text{IP}_3\text{R}$	receptor de 1,4,5-trisfosfato de inositol
LTCCs	canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje de tipo L
MLC	cadena ligera de la miosina
MLCK	cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
MLVs	miocitos lisos vasculares. mmHg milímetros de mercurio
MP	membrana plasmática
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NCX	intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
nM	nanomolar
ORAI1	canal de $\text{Ca}^{2+}$ activado por la liberación de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular tipo 1
PA	potencial de acción cardíaco

PDB	<i>protein data bank</i>
PKA	cinasa de proteínas dependiente de AMPc
PKC	cinasa de proteínas C
PKG	cinasa de proteínas dependiente de GMPc
PLC	Fosfolipasa C
PLN	fosfolamban
PMCA	bomba ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática
RE	retículo endoplásmico
ROCK	cinasa de proteínas de la vía de RhoA-Rho
RS	retículo sarcoplásmico
RyR	receptor de rianodina
SERCA	bomba ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ del retículo sarco/endoplásmico
SHR	ratas espontáneamente hipertensas
SNA	sistema nervioso autónomo
SLN	sarcolipina
SOCE	<i>Store-Operated <math>\text{Ca}^{2+}</math> Entry</i>
STIM1	molécula de interacción del estroma 1
STOCs	corrientes salientes, transitorias y espontáneas de $\text{K}^+$
STZ	estreptozotocina
TGN	tapsigargina
TRPC6	canal receptor de potencial transitorio 6 de la subfamilia C
TTCC	canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje de tipo T
$\mu\text{M}$	micromolar
Vm	potencial de membrana en reposo
WKY	ratas normotensas Wistar Kyoto

## 1. Introducción

El músculo es un tejido que tiene la capacidad de generar movimiento al contraerse o relajarse. En mamíferos podemos encontrar tres tipos diferentes de músculo: el esquelético, el cardíaco y el liso. Todos generan fuerza que se traduce en contracción y acortamiento, pero difieren en su estructura, localización, y en su función [1].

El músculo esquelético se caracteriza por la presencia de un patrón de bandas claras (isotrópicas, que no alteran la vía de la luz polarizada) y oscuras (anisotrópicas, porque desvían la luz polarizada) que se van alternando regularmente de manera perpendicular al eje longitudinal de la fibra muscular. Estas bandas son conocidas como estriaciones y se deben al arreglo altamente organizado de proteínas en la unidad contráctil o sarcómero. Esta característica la comparte con el músculo cardíaco, en el cual las células contráctiles o cardiomiocitos, también presentan un patrón estriado; mientras que el músculo liso, que forma parte de los órganos huecos y de los vasos sanguíneos, carece de estas estriaciones. A diferencia de otros tipos musculares, el músculo liso presenta una asombrosa diversidad estructural y funcional que dificulta su clasificación. Sin embargo, de manera general, por su localización, se ha clasificado como músculo liso visceral al que forma parte de los órganos huecos como el estómago, el tracto gastrointestinal, la vejiga y el útero, y como músculo liso vascular al que está en los vasos sanguíneos, particularmente en las arterias que integran el sistema circulatorio [1].

El músculo liso se encuentra bajo el control del sistema nervioso autónomo (SNA), lo que significa que su actividad no se puede modificar voluntariamente. Basados en el tipo de respuesta que generan a esta inervación, los músculos lisos fueron clasificados por Emil Bozler en **unitarios** y **multiunitarios** [2]. Los primeros presentan actividad eléctrica y mecánica sincronizada, lo cual permite que generen una respuesta coordinada ante un estímulo neuro-humoral debido a la presencia de uniones comunicantes o *gap junctions* entre las células de músculo liso (CML) que lo conforman, favoreciendo la propagación del potencial de acción (PA) hacia las células vecinas. Algunas CML del tipo unitario funcionan como marcapasos generando PA espontáneos, que controlan la actividad del músculo liso completo mediante cambios en la frecuencia de los PA. La contracción del músculo liso unitario se puede inducir por estiramiento, como en el estómago, el tracto gastrointestinal, el útero y algunos vasos sanguíneos de pequeño calibre [1, 2]. Por otra parte, las CML del tipo multiunitario no presentan uniones comunicantes, por lo que el músculo completo está compuesto por varias unidades contráctiles autónomas inervadas por el SNA cuya contracción dependerá del número de CML que se estimulan y de la frecuencia de la estimulación nerviosa. Las hormonas circulantes pueden incrementar o reducir la actividad contráctil, pero el estiramiento no afecta la contracción de este tipo de músculo liso. Ejemplos de músculo liso del tipo multiunitario son el que forma parte de las vías respiratorias, de las arterias de gran calibre y los miocitos lisos unidos al folículo capilar [1].

El sistema circulatorio de los mamíferos está integrado por dos circuitos interconectados en el corazón: uno corresponde a

la circulación pulmonar, en el cual la arteria pulmonar transporta la sangre desoxigenada (proveniente de los tejidos) desde el ventrículo derecho del corazón hasta los pulmones, con el fin de realizar el intercambio gaseoso  $\text{CO}_2$ - $\text{O}_2$ . Posterior a éste, la sangre retorna a la aurícula y ventrículo izquierdo del corazón, para continuar su paso por el otro circuito que corresponde a la circulación sistémica; en el cual se transporta la sangre oxigenada desde el ventrículo izquierdo hacia la aorta para distribuirse a través de los vasos sanguíneos conocidos como arterias hacia los órganos que irriga, y retorna de los mismos a través de los capilares y las venas. El sistema vascular a su vez se divide en macrovasculatura (que corresponde a las arterias y venas de mayor diámetro, como la aorta y la vena cava inferior) y microvasculatura (conformada por las arterias de menor calibre, las arteriolas, los capilares y las venas de pequeño calibre).

Las arterias presentan una estructura básica: partiendo del lumen del vaso hacia el exterior encontramos la capa interna o *túnica íntima* formada por una monocapa de células endoteliales adherida a una delgada capa de tejido conectivo; continuamos con la túnica media constituida principalmente por una capa concéntrica de CML llamadas también miocitos lisos vasculares (MLVs) que rodean al lumen del vaso y están embebidas en una matriz extracelular de elastina y colágeno, que le proporciona una estructura rígida y contráctil al vaso; y por último, la capa externa o *túnica adventicia*, formada por tejido conectivo que funciona como anclaje del vaso al órgano que irriga y contiene a las terminales nerviosas. Las arterias más pequeñas y las arteriolas son las que ofrecen la mayor resistencia al flujo de sangre, de ahí su nombre de *arterias de resistencia* [3].

## 2. Características y función fisiológica de las arterias de resistencia

Las arterias de resistencia (o arterias miogénicas) son aquellos vasos sanguíneos localizados justo antes de los capilares (vasos pre-capilares) que distribuyen la sangre a la microcirculación, contribuyen pasivamente a la resistencia periférica total y regulan activamente el flujo sanguíneo ante un estímulo físico u hormonal, o en condiciones de demanda alterada, como la que se presenta en la respuesta de lucha o huida. Por otro lado, las arterias de mayor calibre que presentan baja resistencia al flujo sanguíneo y por lo tanto mayor distensibilidad (o arterias de conductancia) no contribuyen a la resistencia periférica total [3, 4]. De manera clásica, se han definido a las arterias de resistencia como aquellas que tienen un diámetro interno máximo en el rango de 100 a 500  $\mu\text{m}$ ; sin embargo, este rango no está ampliamente aceptado [5]. Las arterias de resistencia tienen una túnica media compuesta exclusivamente de dos o más capas de MLVs que rodean a las células endoteliales, las cuales están formando el lumen del vaso. Se diferencian de las arterias de conductancia como la aorta y las carótidas, ya que estas últimas presentan un mayor contenido de fibras elásticas en su túnica media, lo que facilita su distensibilidad en respuesta al incremento en el flujo sanguíneo [5].

El tono miogénico arterial y por lo tanto la respuesta miogénica son propiedades distintivas de las arterias de resistencia [6]. Un

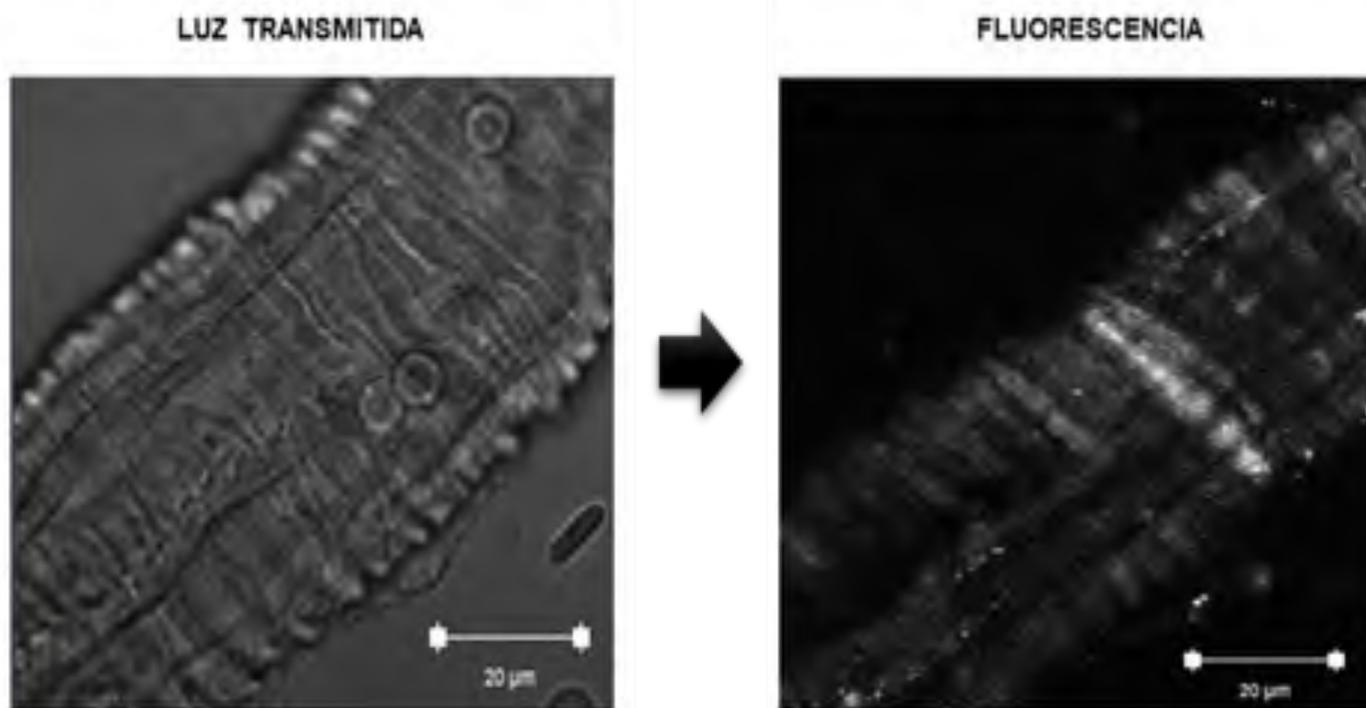


Figura 1. Localización transversal de los miocitos lisos vasculares en la *túnica media* de un segmento de arteria cerebral de rata. Imágenes de luz transmitida (*izquierda*) y de fluorescencia (*derecha*) de un segmento de arteria cerebral de rata, cargado con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescente, Fluo-4. Los miocitos lisos vasculares se localizan de manera transversal al eje longitudinal de la arteria, de manera que su contracción reduce el diámetro del vaso, mientras que su relajación lo aumenta. En el lumen de la arteria se observan algunos eritrocitos. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal LSM 700 (Zeiss) con un objetivo 63X de inmersión en aceite [11].

pequeño incremento de la presión intravascular induce el estiramiento y la despolarización gradual del potencial de membrana ( $V_m$ ) de los MLVs (cerca de  $-60$  mV en reposo) favoreciendo cierto nivel de contracción tónica arterial, conocido como tono miogénico arterial (presente en ausencia de estímulos neuro-hormonales) [6, 7]. En otros términos, el tono miogénico arterial es la contracción basal que presentan los MLVs sobre la cual actúan las señales vasoconstrictoras o vaso-relajadoras como iones, neurotransmisores, hormonas, sustancias derivadas del endotelio, y metabolitos locales. Por otra parte, la respuesta miogénica arterial es el mecanismo autorregulador de la contracción de los MLVs y del diámetro arterial, ante un rango cambiante de presiones sistémicas y de estímulos neuro-humorales, que permite mantener el flujo sanguíneo constante. El tono y la respuesta miogénica son independientes del endotelio, ya que sólo participan los MLVs de las arterias de resistencia, y por lo tanto son los que le proporcionan las propiedades mecánicas al vaso en condiciones basales (tono miogénico) y regulan su diámetro de manera activa (respuesta miogénica) ante los estímulos neuro-hormonales [5, 6].

La figura 1 muestra imágenes obtenidas en un microscopio confocal donde se observa la localización transversal de los MLVs en una arteria cerebral pequeña, cargada con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescente Fluo-4. La contracción ante diversos estímulos (mecánicos, neuro-humorales y locales) y la relajación (en la que participa activamente la bomba SERCA) son determinadas por

la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) de los MLVs, lo que regula de manera activa el diámetro de las arterias y por lo tanto el flujo sanguíneo.

### 3. Regulación del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en los miocitos lisos vasculares de las arterias de resistencia

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un mensajero intracelular fundamental que participa en la transducción de diversas señales celulares, entre ellas, las que participan en la contracción y la relajación de los MLVs [8]. El tono vascular está determinado por el estado contráctil de los MLVs dentro de la pared de los vasos sanguíneos, el cual depende de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  en reposo, que en condiciones fisiológicas se mantiene en el rango de 100 nanomolar (nM) [8, 9]. Por otra parte, los incrementos globales de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  en el rango de 0.2 a 0.8 micromolar ( $\mu\text{M}$ ) inducen la contracción de los MLVs y la vasoconstricción arterial, mientras que la vaso-relajación depende de mecanismos que limiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y que favorezcan la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia los depósitos intracelulares para que la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  retorne a los valores de reposo [10].

En esta regulación dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular participan diferentes proteínas, tales como: canales iónicos que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular o su liberación de los depósitos intracelulares, localizados principalmente en el RS;

bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  que participan de manera activa en disminuir la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ; intercambiadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , como el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) de la membrana plasmática (MP); proteínas que amortiguan y almacenan el  $\text{Ca}^{2+}$  en los distintos compartimentos subcelulares, y proteínas que participan en la transducción de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  como mensajero intracelular [10, 12–14]. Entre los canales iónicos que se sitúan en la MP de los MLVs se encuentran los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L (LTCCs) cuya subunidad  $\alpha 1C$  formadora del poro del canal es  $\text{Ca}_v1.2$ ; los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo T (TTCCs) cuya subunidad  $\alpha 1H$  formadora del poro del canal es  $\text{Ca}_v3.2$ , aunque también se ha reportado  $\text{Ca}_v3.1$ ; los canales de  $\text{K}^+$  de alta conductancia dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y voltaje (canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , conformados por dos subunidades  $\alpha$  y hasta 4 subunidades  $\beta 1-4$ ); los canales de  $\text{K}^+$  de baja conductancia (SKCa), así como la bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (PMCA). Por otra parte, en la membrana del RS se localizan el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular conocido como receptor de Rianodina (RyR), el receptor de 1,4,5 trisfosfato de inositol ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), y la bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico (bomba SERCA) [10, 12–14]. Cualquiera alteración en la expresión o actividad de estas proteínas puede favorecer una vasoconstricción anormal y promover la incidencia de accidentes cerebrovasculares en patologías como la hipertensión [13, 14].

#### 4. Participación del $\text{Ca}^{2+}$ en la contracción y la relajación de los miocitos lisos vasculares

El aumento en la presión intravascular (en el rango de 10 a 80 mmHg) promueve la respuesta miogénica arterial, la cual induce la despolarización de los MLVs por activar principalmente al canal receptor de potencial transitorio 6 de la subfamilia C (TRPC6) [15]. Esta despolarización incrementa la probabilidad de apertura de  $\text{Ca}_v1.2$  y el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  que participa en la contracción también puede provenir de los reservorios intracelulares en el RS mediante: 1) la participación de receptores de siete pasos transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs), los cuales activan a la fosfolipasa C. Esta enzima genera diacilglicerol (DAG) y el segundo mensajero  $\text{IP}_3$ , cuya unión a su receptor, el  $\text{IP}_3\text{R}$ , produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS; 2) la activación del RyR, y 3) el mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (conocido también como SOCE, por *Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry*), lo que provoca la agregación de monómeros de la molécula de interacción del estroma 1 (STIM1) en la membrana del RS, reclutando al canal de  $\text{Ca}^{2+}$  activado por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tipo 1 (ORAI1) en la membrana plasmática, y permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma. De hecho, diversas fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden estar involucradas en promover la contracción, dependiendo del mecanismo de excitación [13, 14].

El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  activa a la maquinaria contráctil de los MLVs, lo que reduce el lumen de las arterias (fenómeno conocido como vasoconstricción), e incrementa la resistencia vascular. La contracción de los MLVs se induce cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la proteína calmodulina (CaM) que cuenta con cuatro do-

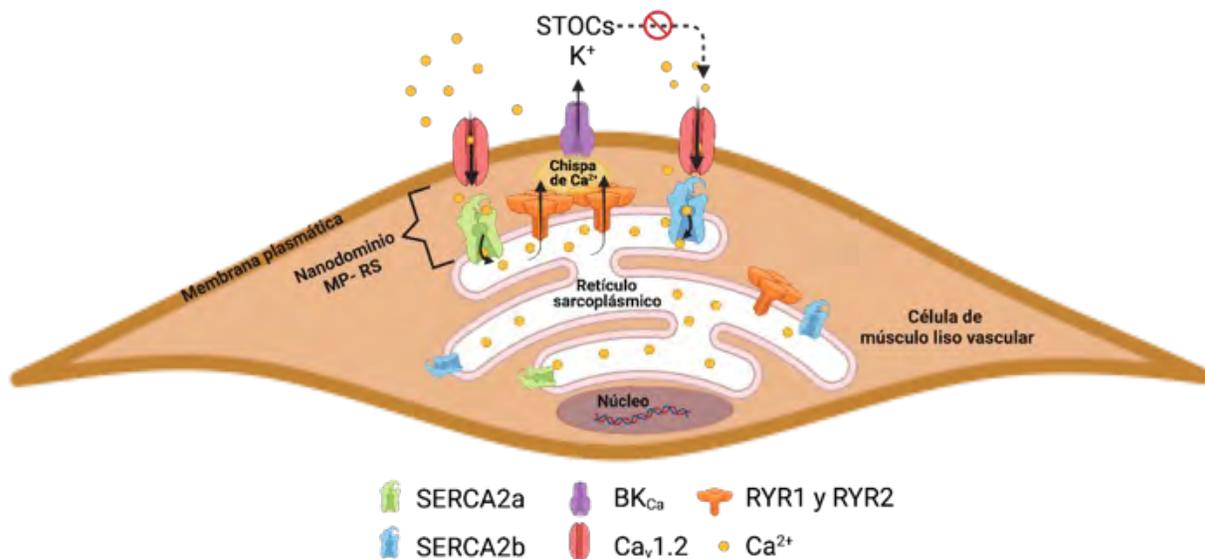
minios estructurales con alta afinidad por este catión (manos EF). El complejo Ca-CaM activa a la subunidad catalítica de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que como su nombre lo indica, fosforila a la miosina de 20 kDa (MLC) en la serina 19 (Ser19). Esta fosforilación induce un cambio conformacional en el dominio globular de la miosina que aumenta su actividad ATPasa y le permite interactuar con la actina para fungir como un motor molecular [13, 14]. Así, la proteína transdutora de los incrementos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  que activa a la maquinaria contráctil en el músculo liso es la CaM, a diferencia del músculo estriado en donde esta función la hace la troponina C.

Para que ocurra la relajación es necesario que disminuya la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  por la actividad de las bombas, principalmente la PMCA y la SERCA, así como en menor proporción por la acción del NCX; esto desactiva a la MLCK y permite que la MLC sea desfosforilada por la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) lo que conduce al desacople de la actina-miosina y favorece la relajación [16]. De manera interesante, la contracción de los MLVs puede ser inducida por mecanismos independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que mantienen a la MLC fosforilada. Existen dos vías implicadas principalmente, la vía de fosfolipasa C (PLC)-DAG proteína cinasa C (PKC), y la vía de RhoA-Rho cinasa (ROCK). En el caso de la vía que involucra a la PKC, ésta fosforila al inhibidor específico de la MLCP (CPI-17), favoreciendo su unión a esta fosfatasa e inhibiendo su actividad. La PKC adicionalmente fosforila a proteínas de unión a actina, como la calponina y la CaM, que promueven la interacción actina-miosina [17, 18]. En el caso de la vía de ROCK, posterior a la activación de los GPCR se promueve la activación de la proteína G pequeña RhoA, que activa a la cinasa ROCK quien también inactiva a la MLCP lo que provoca la contracción sostenida. Así mismo, ROCK fosforila a CPI-17, favoreciendo su unión a la MLCP e inhibiendo su actividad [17, 18].

El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  también induce un aumento en la actividad de la bomba SERCA encargada de recapturar el  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma hacia los depósitos intracelulares. A su vez, el incremento momentáneo en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  del lumen del RS, activa grupos de RyRs de una forma rápida y momentánea generando liberaciones locales y transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma, conocidas como chispas de  $\text{Ca}^{2+}$ , las cuales a su vez activan directamente a los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  y éstos generan corrientes salientes transitorias y espontáneas de  $\text{K}^+$  (o STOCs por sus siglas en inglés) que reducen la probabilidad de apertura de los LTCCs, dando como resultado la disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  y la relajación del músculo liso [7, 13, 19, 20]. Este proceso se esquematiza en la figura 2.

La existencia de posibles liberaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  locales y transitorias fue propuesta en 1986 por Benham y Bolton, al registrar los STOCs [21]. Con la introducción de la microscopía confocal y la síntesis de indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  que emiten luz en el rango visible fue posible visualizar y registrar por primera vez estos eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en MLVs, eventos a los que se les denominó chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  [7]. Estudios posteriores determinaron que las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurren en sitios restringidos dentro de la célula, denominados sitios de descarga frecuentes, localizados generalmente en el nanodominio entre la MP y el RS enriquecido con RyRs [22] (Figura 2).

Los MLVs expresan las tres isoformas conocidas de los RyRs (RyR1, RyR2 y RyR3), las cuales se distribuyen diferencialmente



**Figura 2. Participación del  $Ca^{2+}$  en la contracción y relajación de los MLVs.** El aumento de la presión intravascular despolariza a los MLVs promoviendo la apertura de  $Ca_v1.2$  y el influjo de  $Ca^{2+}$  en la membrana plasmática (MP) lo que incrementa la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  e induce la contracción. Este aumento en la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  también activa a las isoformas de la bomba SERCA,  $SERCA2a$  y  $SERCA2b$ , que recapturan el  $Ca^{2+}$  hacia los reservorios intracelulares localizados principalmente en el retículo sarcoplásmico (RS). El aumento del nivel de  $Ca^{2+}$  del RS promueve la activación de grupos de receptores de rianodina (RyRs), que generan incrementos locales y transitorios de  $Ca^{2+}$  conocidos como chispas de  $Ca^{2+}$ . Las chispas que se producen en la región subplasmalemal, en el nanodominio de MP-RS, activan a los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  y de voltaje de conductancia grande de la MP (o canales  $BK_{Ca}$ ) generando corrientes de  $K^+$  transitorias y espontáneas conocidas como  $STOCs$ , lo que induce la hiperpolarización de la MP. Esto disminuye la probabilidad de apertura de  $Ca_v1.2$  y la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , lo que favorece la relajación. Imagen elaborada con BioRender.com.

entre los diferentes compartimentos subcelulares. Por ejemplo, en los MLVs de arterias cerebrales se ha reportado que el  $RyR1$  se localiza principalmente en el citoplasma de las células, región conocida también como extraperinuclear, y en menor proporción entre las zonas superficial o subplasmalemal (o nanodominio MP-RS) y perinuclear. Por otra parte, el  $RyR2$  es la isoforma más abundante en estas células y se localiza predominantemente en el nanodominio MP-RS, seguido por la región extraperinuclear y en menor proporción en la perinuclear. Por último, el  $RyR3$  se encuentra distribuido predominantemente en la región extraperinuclear y perinuclear y está prácticamente ausente en la subplasmalemal [23]. La relevancia funcional de la distribución subcelular diferencial de las isoformas del  $RyR$ s en los MLVs no se conoce a detalle. Lo que sabemos es que las isoformas involucradas en la generación de las chispas de  $Ca^{2+}$  son el  $RyR1$  y el  $RyR2$ , mientras que el  $RyR3$  no contribuye de manera significativa [20].

Las chispas de  $Ca^{2+}$  se estudian mediante el análisis de sus propiedades espaciotemporales, como la frecuencia (eventos/s), la duración (ms), el tamaño ( $\mu m$ ), el tiempo de subida al pico (ms) y la amplitud (en unidades de fluorescencia máxima respecto a una fluorescencia basal) que dependen del número de  $RyR$  en los grupos o clústeres y de su probabilidad de apertura. La actividad de los  $RyR$ s se encuentra regulada por  $Ca^{2+}$  (tanto del lado citoplasmático como del luminal), por modificaciones post-traduccionales (fosforilación, oxidación, y nitrosilación, entre las más importantes) y por proteínas accesorias (localizadas tanto del lado citoplasmático como del luminal). En el lado citoplasmático

encontramos a las proteínas de la familia de inmunofilinas de 12 y 12.6 kDa (FKBP12 y FKBP12.6), a la  $CaM$ , y la sorcina, que al interactuar con el  $RyR$  pueden estabilizar su estado cerrado, mientras que su disociación, conduce al incremento en la probabilidad y duración de apertura del canal iónico, incidiendo en cambios en las propiedades espaciotemporales de las chispas de  $Ca^{2+}$  en los MLVs [24–26].

Por otra parte, la fosforilación del  $RyR$  por  $PKA/PKG$  incrementa la frecuencia de las chispas de  $Ca^{2+}$  y la actividad de los  $STOCs$  aumentando la vaso-relajación [27]; mientras que activadores de la  $PKC$  reducen la frecuencia de las chispas de  $Ca^{2+}$  y de los  $STOCs$ , disminuyendo la vaso-relajación [28]. Adicionalmente, la participación de las chispas de  $Ca^{2+}$  en inducir vaso-relajación se ha demostrado con inhibidores farmacológicos de los  $RyR$ s, que bloquean estas liberaciones locales de  $Ca^{2+}$  y a los  $STOCs$  asociados, disminuyendo el diámetro arterial [7, 29, 30]. Sin embargo, es importante enfatizar que también se ha reportado una correlación directa entre el contenido de  $Ca^{2+}$  del RS y la actividad de la bomba  $SERCA$ , con la frecuencia y amplitud de las chispas de  $Ca^{2+}$  [31–33], lo que hace relevante determinar cómo se regula la expresión y actividad de la bomba  $SERCA$  en los MLVs.

### 5. Participación de la bomba SERCA en el amortiguamiento del $\text{Ca}^{2+}$ en el nanodominio MP-RS en los MLVs

La idea de que en los MLVs existe un sistema de amortiguamiento superficial de  $\text{Ca}^{2+}$ , en donde recientemente se determinó que participa la bomba SERCA, surgió a partir de las observaciones iniciales de Devine y cols., quienes en 1972, demostraron mediante microscopía electrónica de barrido la existencia de regiones del RS superficial muy cercanas a la MP, especialmente en las zonas de las caveolas [34]. En esta región, también conocida actualmente como subplasmalemal o nanodominio MP-RS (Figura 2), el RS superficial se encuentra a una distancia de entre 10 hasta 100 nm de la MP y desempeña un papel esencial en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , debido a la localización preferencial de proteínas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en este nanodominio, entre ellas la bomba SERCA [20, 34, 35]. El nanodominio MP-RS tomó relevancia funcional con los experimentos de Van Breemen, quien, usando anillos de aorta de conejo, analizó la contracción inducida por noradrenalina o por alto  $\text{K}^+$  y observó que la adición de cloruro de lantano (para bloquear a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ), durante o posterior a la aplicación de la solución despolarizante, le permitía regular el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y la contracción [36]. Van Breemen también observó una disociación entre la velocidad del influjo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  y la contracción del músculo liso y propuso que el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular inicialmente incrementaba el nivel de este catión en la región subplasmalemal y posteriormente en la región citoplásmica [36]. Esta idea de Van Breemen recibió el nombre en inglés de *superficial buffer barrier* o barrera superficial amortiguadora de  $\text{Ca}^{2+}$  y aunque no se mencionó de manera explícita, ésta requiere la participación fundamental de la bomba SERCA. Esta hipótesis planteó la existencia de dominios de  $\text{Ca}^{2+}$  funcionales dentro de los MLVs, en donde se podían reconocer 1) un dominio contráctil, que abarca la mayor parte del citoplasma y, 2) un nanodominio subplasmalemal, conformado por el citoplasma entre el RS y la MP, este último dominio frecuentemente puede llegar a tener la misma  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  o incluso mayor que la que presenta el dominio contráctil, sin participar en la contracción. El gradiente de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  que se establece entre ambos dominios desempeña un papel esencial en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el RS y la atenuación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  en la región profunda del citoplasma, debido a la difusión restringida de  $\text{Ca}^{2+}$  [35, 37].

Esta teoría considera la existencia de una superficie fenestrada del RS muy cercana a la MP (RS subplasmalemal o superficial) en donde parte del  $\text{Ca}^{2+}$  entrante es efectivamente extruido por la PMCA y el NCX antes de llegar al mioplasma profundo. En ese nanodominio de MP-RS, el  $\text{Ca}^{2+}$  también es recapturado por la bomba SERCA directamente al RS superficial que actúa entonces como una barrera limitante al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , de manera que la contracción solo ocurre si el  $\text{Ca}^{2+}$  entrante llega al citoplasma profundo donde se encuentran los miofilamentos de actina-miosina activados por el complejo Ca/CaM, pero no por el  $\text{Ca}^{2+}$  en el nanodominio MP-RS [38, 39]. También predice que es posible disociar temporalmente la señal del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  con el desarrollo de la fuerza contráctil; experimentalmente es apoyada por la observación de que la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del SR estimula la contracción antes

que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  vía los LTCCs, retrasando y reduciendo el desarrollo de la fuerza contráctil por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  [40]. Esta teoría resalta la participación de la bomba SERCA y del RS superficial en el control de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  y la actividad contráctil [41].

La contribución de la bomba SERCA a la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, la generación de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y la vaso-relajación está respaldada por los resultados obtenidos en MLVs del ratón transgénico deficiente de fosfolamban (PLN), proteína que regula la actividad de la bomba SERCA, en donde se observaron aumentos en la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, en la frecuencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y en los STOCs en MLVs de arterias cerebrales [32]. Además, la inhibición farmacológica de los RyRs y la bomba SERCA inhibe la generación de chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y de STOCs al reducir el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS [7, 29].

Recientemente, un trabajo realizado en nuestro laboratorio nos permitió obtener datos experimentales que sustentan la existencia de esta barrera superficial amortiguadora de  $\text{Ca}^{2+}$  en los MLVs de arterias mesentéricas. Demostramos que la bomba SERCA limita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en MLVs de arterias mesentéricas, incluso en condiciones en donde el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  puede estar exacerbado debido a un incremento en la expresión de  $\text{Ca}_v1.2$ , inducido por aldosterona, una hormona mineralocorticoide asociada a la hipertensión [42].

Todas estas observaciones apoyan la teoría del amortiguamiento superficial del  $\text{Ca}^{2+}$  en los MLVs y permiten postular a la bomba SERCA como parte de la unidad funcional que regula la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Adicionalmente, nos permiten postular a la bomba SERCA como proteína clave en la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia los reservorios localizados en el RS superficial y un componente crítico en la modulación de la frecuencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y los STOCs que impactan directamente en la vaso-relajación [20, 42].

### 6. La bomba SERCA del músculo liso vascular: características y subtipos

La bomba SERCA es una de las proteínas clave en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los MLVs; participa principalmente en: 1) restaurar los reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, necesarios para la contracción dependiente de los GPCRs; y aunque parezca contradictorio 2) favorecer la relajación, mediante la generación de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y el mantenimiento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  basal. La bomba SERCA transporta al  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma hacia el lumen del RS en contra de su gradiente de concentración, por lo que utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para disminuir la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Por cada molécula de ATP hidrolizada, transporta dos iones  $\text{Ca}^{2+}$ , manteniendo una diferencia de 10,000 veces entre la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  (que se encuentra en el rango de nM) y la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el lumen del RS (en el rango de alto  $\mu\text{M}$ ) en condiciones de reposo [43, 44].

Las bombas SERCA forman parte de la familia de las ATPasas de tipo P, por su capacidad de auto-fosforilarse en el residuo de ácido aspártico 351 (Asp351); esta propiedad la utilizan para bombear  $\text{Ca}^{2+}$  al alternar la afinidad y accesibilidad de los sitios de unión a este catión.

En los mamíferos se han identificado tres genes: *ATP2A1*, *ATP2A2* y el *ATP2A3*, que codifican hasta doce isoformas de la bomba SERCA mediante la edición y maduración diferencial de los mRNAs codificantes, mecanismo conocido como *splicing alternativo* [45]. El gen *ATP2A1* genera las isoformas SERCA1a y SERCA1b. Esta última se expresa durante las primeras etapas del desarrollo fetal y su expresión se va sustituyendo por la isoforma SERCA1a durante el crecimiento del feto. La bomba SERCA1a se expresa principalmente en el músculo esquelético de contracción rápida, y también se ha reportado su presencia en el corazón, pero no de forma predominante [45]. El gen *ATP2A2* genera cuatro isoformas: SERCA2a, SERCA2b, SERCA2c y SERCA2d. SERCA2a se expresa principalmente en músculo cardíaco y en menor medida en músculo esquelético y liso. SERCA2b se expresa de manera ubicua. SERCA2c se encontró principalmente en corazón. Por último, SERCA2d es la isoforma menos estudiada ya que su existencia como proteína endógena no está bien establecida. Finalmente, el gen *ATP2A3* produce seis isoformas por el mecanismo ya mencionado de *splicing alternativo*, dando lugar a la familia de SERCA más grande conocida: SERCA3a, SERCA3b, SERCA3c, SERCA3d, SERCA3e, SERCA3f. Se ha determinado que SERCA3a, SERCA3d y SERCA3f se expresan de manera ubicua y muy frecuentemente se co-expresan con SERCA2b en un grupo selecto de células o tejidos como el del colon, epitelio gástrico, endotelio vascular, células  $\beta$ -pancreáticas, y de Purkinje. Sin embargo, a pesar de que sí es posible detectar mRNA de estas isoformas, muchas veces su expresión proteica es baja e incluso indetectable [45, 46].

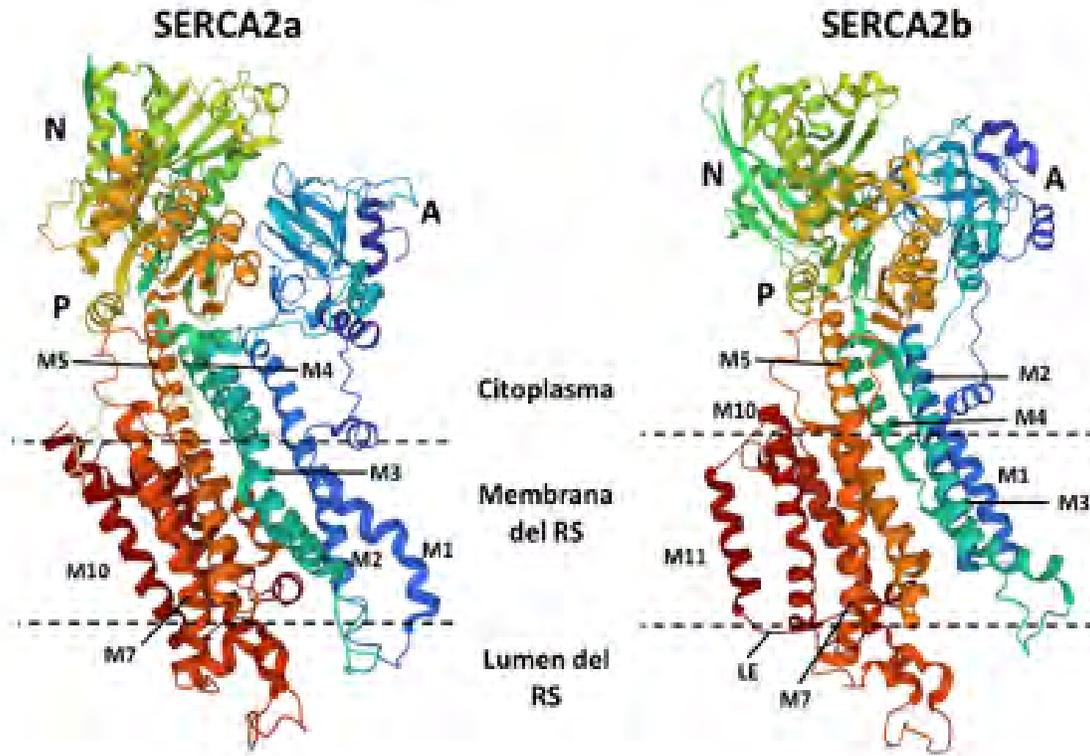
Estructuralmente la bomba SERCA está constituida por una sola cadena polipeptídica de ~1000 residuos de aminoácidos (aa's) y tiene una masa molecular aproximada de 110 kDa. La primera estructura terciaria reportada fue la de SERCA1a, que se purificó a partir de músculo esquelético de conejo, en el 2000 [43]. Esta isoforma se ha usado para estudiar a detalle su mecanismo de acción, el cual comparte en gran medida con las otras isoformas, debido a su alta homología. En la SERCA1a se determinaron cuatro dominios, tres de los cuales se encuentran en la región citoplasmática y constituyen la parte superior de la enzima: el dominio de unión a nucleótido (N), el dominio accionador (A), y el dominio de autofosforilación (P), que contiene el aa auto-fosforilable (Asp351), el residuo de aa que coordina el  $Mg^{2+}$  (Asp703) y otros residuos de aa's de gran relevancia para las ATPasas de tipo P [43]. El cuarto dominio es el transmembranal que en la mayoría de las isoformas de SERCA consta de diez  $\alpha$ -hélices transmembranales (M1-M10); siendo la excepción la SERCA2b que cuenta con once  $\alpha$ -hélices transmembranales (M1-M11) y un asa luminal adicional, la cual incrementa su afinidad por el  $Ca^{2+}$  y reduce la velocidad máxima de recambio [44, 47]. En la SERCA1a hay dos sitios de unión a  $Ca^{2+}$  ubicados subsecuentemente, en la interfase de la membrana del RS. Uno de los sitios de unión a  $Ca^{2+}$  está ubicado en un área rodeada por las hélices M5, M6 y M8, mientras que el segundo sitio está en la hélice M4, parcialmente desenrollada que proporciona tres carbonilos de la cadena principal para la coordinación del  $Ca^{2+}$  [43, 48, 49].

Debido a su alta homología estructural, estos dominios también están presentes en SERCA2a y SERCA2b (Figura 3). Es-

tas dos isoformas se diferencian entre sí por la cantidad de aa's que las codifican: la SERCA2a consta de 997 aa's, mientras que la SERCA2b contiene 1042 aa's en su secuencia. Ambas isoformas presentan una identidad muy alta, ya que los primeros 993 aa's son iguales en ambas, mientras que los últimos cuatro aa's de SERCA2a son sustituidos por 49 aa's en SERCA2b [50]. Estos aa's adicionales en la región C-terminal de SERCA2b le generan un bucle citosólico extra entre las hélices transmembranales 10 y 11 (L10/11; aa's de 994 a 1012), una hélice transmembranal extra (M11; de los aa's 1013 a 1030) y una cola de extensión luminal (LE; aa's 1031 a 1042), lo que le confiere propiedades funcionales intrínsecas, debido a las interacciones que se generan con el resto de la proteína [47] (Figura 3). Por ejemplo, la Phe1018 de la M11 interacciona mediante fuerzas de Van der Waals con el Trp927 del bucle citosólico 8/9. Además, la Val1029 de M11 tiene interacciones con Leu967, Leu970 y Lys971 de M10 [51]. Mediante análisis de crio-microscopía electrónica, el grupo de Zhang y colaboradores identificaron un acercamiento importante de LE hacia M7, promoviendo interacciones con el bucle luminal formado entre M7 y M8 (L7/8) [47]. Por lo que M11 y LE están desempeñando un papel importante en la estabilización de los estados conformacionales de la bomba SERCA2b, lo que genera propiedades cinéticas diferentes en esta isoforma respecto a las otras que carecen de estas dos extensiones estructurales. En análisis funcionales, el grupo de Inoue y colaboradores reportó una disminución de 2.3 veces en la  $V_{max}$  de SERCA2b con respecto a la de SERCA2a ( $SERCA2b = 1.8 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$  y  $SERCA2a = 4.2 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$ ), y también observaron un decremento en la  $K_d$  para la unión a  $Ca^{2+}$  en SERCA2b ( $0.21 \mu\text{M}$ ) respecto a la de SERCA2a ( $0.35 \mu\text{M}$ ). Por lo que, SERCA2b presentó una actividad menor de ATPasa con una afinidad mayor por  $Ca^{2+}$ , lo que le confiere propiedades enzimáticas diferentes, a pesar de compartir una secuencia aminoacídica casi idéntica con la SERCA2a [51]. Interesantemente, cuando a SERCA2a se le adicionó exógenamente un péptido sintético que emula al fragmento LE de la SERCA2b, éste inhibió la actividad ATPasa de la SERCA2a e incrementó su afinidad por el  $Ca^{2+}$ , sugiriendo que el fragmento LE es capaz de interactuar directamente con la SERCA2a y es un modulador crucial de su afinidad por  $Ca^{2+}$  [52]. Por otro lado, la afinidad de las isoformas de SERCA3 por  $Ca^{2+}$  es mucho menor que la de SERCA2b y hasta diez veces más baja que la de SERCA1a; sugiriendo que las isoformas de SERCA3 se activan solo a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  muy elevadas; sin embargo, presentan una velocidad de recambio más rápida (alrededor de  $100 \text{ s}^{-1}$ ) [45,50].

En el sitio web de *Protein Data Bank* (PDB, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) se pueden contabilizar tres estructuras terciarias de la SERCA2a, una corresponde a la isoforma de humano (7BT2) [44], mientras que las otras dos se obtuvieron de la isoforma de corazón de cerdo (5MPM, y 6HXB) [53]. En el caso de SERCA2b, se pueden encontrar catorce estructuras proteicas provenientes de *Homo sapiens* (6JJU, 5ZTF, 6LN5, 6LN6, 6LN7, 6LN8, 6LN9, 6LLY, 6LLE, 7E7S, 7W7T, 7W7U, 7W7V, y 7W7W)[47, 51, 54], las cuales presentan los mismos dominios estructurales reportados para la SERCA1a.

Precisamente, las isoformas predominantes en los MLVs son SERCA2a y SERCA2b, siendo la SERCA2b la que se expresa mayoritariamente en estas células (Tabla 1). También en cultivos



**Figura 3. Estructura de las isoformas de la bomba SERCA2a y SERCA2b.** Las isoformas SERCA2a y SERCA2b son las más abundantes en el músculo liso vascular. Estructuralmente ambas isoformas cuentan con cuatro dominios; de los cuales tres son citoplasmáticos, denominados: 1) dominio de unión a nucleótido (N), 2) dominio de fosforilación (P) y 3) dominio accionador (A). El cuarto dominio está embebido en la membrana del RS y está constituido de diez hélices transmembranales (M1-M10) en la SERCA2a (*izquierda*) y de once (M1-M11) en la SERCA2b (*derecha*). La cadena polipeptídica de la SERCA2a está constituida de 997 residuos de aa's (Uniprot ID: P16615-2) mientras que la de SERCA2b cuenta con 1042 aa's (isoforma canónica P16615-1). Ambas isoformas comparten una identidad muy alta (99.6%) debido a que los primeros 993 aa's son idénticos. Los aa's adicionales en SERCA2b se encuentran en la región C-Terminal y comprenden 49 residuos que forman un bucle citosólico extra entre las hélices transmembranales 10 y 11 (L10/11), una hélice transmembranal extra (M11) y finalmente una extensión luminal (LE). Estructuras obtenidas en *Protein Data Bank* (PDB), para SERCA2a corresponde al PDB ID: 7BT2 [44] y para SERCA2b corresponde al PDB ID: 6LLY [47].

primarios de MLVs de aorta torácica de rata se detectó SERCA3, aunque en una cantidad muy baja en comparación con la SERCA2a y SERCA2b [55]. En ese mismo trabajo se reportó la expresión diferencial de SERCA2a (6%), SERCA2b (91%) y SERCA3 (3%), y de manera interesante, el tratamiento prolongado con taspigargina (TGN, 0.5  $\mu$ M, 10 h), un inhibidor muy selectivo de las bombas SERCA, indujo el vaciamiento de los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, e incrementó los niveles de mRNA de SERCA2b (4 veces) y SERCA 3 (10 veces), sin alterar los de SERCA2a. Los autores de este trabajo sugieren que el aumento en los niveles citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  induce la expresión de la bomba SERCA [55]. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular que promueve la expresión específica de una isoforma proveniente del mismo gen ATP2A2 (en este caso SERCA2b) y no de la otra (SERCA2a).

Con respecto a la distribución subcelular de las isoformas de SERCA que se expresan en MLVs se sabe muy poco. Un trabajo realizado en MLVs de arteria pulmonar mostró una localización subcelular diferencial de SERCA2a y SERCA2b, que se relacionó con una segregación funcional del  $\text{Ca}^{2+}$  que se puede liberar del RS.

La SERCA2b se localizó principalmente en la región subplasmalemal, en el nanodominio MP-RS (~72 %); mientras que la SERCA2a se restringió a la región perinuclear (~90 %); por lo que se propuso que tal segregación confiere la posibilidad de que las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS se movilicen de manera estímulo-específica [58].

Por otra parte, en aortas del ratón transgénico deficiente en SERCA2a y que solamente expresaba SERCA2b (SERCA2b/b) determinaron que la contracción inducida por fenilefrina fue mayor en aortas del ratón SERCA2b/b que en aortas del ratón control (SERCA2a/b), aún en condiciones en las que se bloqueó el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  con diltiazem (antagonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  perteneciente a la subclase de las benzotiazepinas, que bloquea a los LTCCs en estado de reposo). Este trabajo permitió postular que la SERCA2b participa de manera importante en el mantenimiento del acople entre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la contracción, lo que coincide con las diferencias en la localización subcelular entre SERCA2a y SERCA2b [50].

La actividad de la bomba SERCA también está regulada principalmente por dos proteínas accesorias, fosfolamban (PLN) y sarcoplipina (SLN), ambas altamente conservadas en los vertebrados.

Tabla 1. Isoformas de SERCA en diferentes tipos de arterias, así como la técnica utilizada para detectarlas.

Tipo de arteria	Isoformas de SERCA que expresa	Método de detección	Referencia
Aorta	SERCA2a SERCA2b SERCA3	Inmunohistoquímica, qPCR, WB	[50, 55–57]
Arteria pulmonar	SERCA2a SERCA2b	Inmunohistoquímica, qPCR, WB	[58]
Arteria mesentérica	SERCA2a SERCA2b	Inmunotinciones	[59]
Arteria carótida	SERCA2a SERCA2b	Inmunotinciones WB	[60]
Arteria mamaria	SERCA2a SERCA2b	Inmunotinciones WB	[61]
Arteria femoral	SERCA2 SERCA3	WB	[57]
Arteria cerebral	SERCA2	WB qPCR	[62]

dos. PLN se expresa principalmente en músculo cardíaco y también en músculo liso, mientras que SLN se expresa en músculo esquelético [63]; sin embargo, salvo por el trabajo de Wellman y colaboradores [32], en el cual la eliminación genética de PLN aumentó la frecuencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  en MLVs, poco se sabe acerca de cómo estas proteínas regulan específicamente la actividad de las bombas SERCA que se expresan en estas células, por lo que son tema actual de estudio.

Se ha determinado que la SERCA2 de MLVs, también se puede activar por señalización redox, mediante la cual el óxido nítrico y el anión superóxido forman peroxinitrito, que favorece la activación de la SERCA2b por la S-glutacionilación reversible de la cisteína 674 (Cys674), resultando en la relajación arterial [64]; sin embargo, hacen falta más estudios para determinar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión y actividad de las isoformas de SERCA en MLVs y los cambios que se pueden presentar en estas proteínas, en algunas patologías vasculares.

### 7. Alteraciones en la expresión y función de la bomba SERCA en algunas patologías vasculares presentes en la era post-Covid

La disrupción de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se asocia con una gran variedad de patologías que afectan la función vascular, como en la hipertensión, la diabetes y la obesidad; estas últimas relacionadas con una mayor incidencia de COVID-19 grave. En el caso particular de la bomba SERCA, no existe información

acerca de cómo la infección con SARS-CoV-2 podría afectar la expresión o actividad de la bomba SERCA, lo cual valdría la pena estudiarse en un futuro próximo.

En el caso de patologías relevantes para el desarrollo de COVID grave como la hipertensión, se sabe que la desregulación en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  se asocia con el incremento en el tono miogénico arterial. Por lo que varios grupos de investigación se han enfocado en estudiar los cambios en la expresión y actividad de la bomba SERCA relacionados con esta patología.

En este sentido, Levitsky y colaboradores observaron ligeros incrementos en la actividad y densidad de la bomba SERCA en aorta torácica de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con respecto a las de las ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY), mientras que en aortas abdominales de ratas SHR se encontró un incremento en el nivel del mRNA de las isoformas de la bomba SERCA2a y SERCA2b en comparación con las WKY [56]. Adicionalmente, en MLVs cultivados de aortas obtenidas de ratas macho SHR se observó un aumento en los niveles del mRNA de la bomba SERCA2 con respecto a los cultivos obtenidos de ratas WKY [65].

Por otra parte, Zulian y colaboradores proporcionaron evidencia de incrementos en la expresión proteica de la bomba SERCA2 en MLVs de arterias mesentéricas de ratas de la cepa con hipertensión de Milán (un modelo de hipertensión en humanos) en relación con las de su contraparte normotensas [66].

También se han reportado alteraciones en la actividad y expresión de la bomba SERCA en MLVs en modelos de animales con diabetes dislipidémica. Más específicamente, Hill y colaboradores, utilizando MLVs de arterias coronarias de cerdos macho de

Yucatán a los que se les indujo un estado diabético con aloxano y alimentación rica en grasas y colesterol (diabetes dislipidémica), reportaron cambios importantes en la capacidad amortiguadora del RS, que se observó incrementada debido al aumento de la expresión de la bomba SERCA2 [67]. En el mismo modelo de cerdos diabéticos y dislipidémicos, Witczak y colaboradores identificaron un incremento en los niveles de expresión de la isoforma SERCA2b en arterias coronarias, que no fue suficiente para compensar el incremento en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por despolarización, ya que los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  basales se encontraron aumentados [68]. Interesantemente, el ejercicio previno el incremento en los niveles de expresión de la bomba SERCA2b y permitió recuperar la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  basal en las arterias coronarias de los cerdos diabéticos y dislipidémicos [68].

Por otra parte, en ratas de la cepa Sprague-Dawley con diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) inducida con estreptozotocina (STZ) y ratas de la cepa Wistar Bio-Breeding (DR-BB) a las que se les indujo diabetes usando el anticuerpo monoclonal anti-RT6, Searls y colaboradores identificaron una disminución del 48% en la expresión de la bomba SERCA2 y un 52% de SERCA3 en MLVs de aortas de estas ratas DR-BB en comparación con las no diabéticas, estos resultados fueron similares a los obtenidos en MLVs de arterias femorales [57]. Contrario a estos resultados, en aortas de ratas diabéticas generadas con STZ no encontraron cambios en la expresión de la bomba SERCA2 en MLVs de aortas, en comparación con los controles; en cambio, en las arterias femorales sí se observó una reducción del 32% de la expresión de la bomba SERCA2 [57], por lo que el efecto de la DM1 en la expresión de la bomba SERCA que se expresa en MLVs de diferentes tipos de músculo liso vascular no es consistente y se requiere más investigación al respecto.

En modelos de ratas obesas no se han reportado cambios en la expresión de la bomba SERCA en tejidos vasculares, a pesar de que existe evidencia de un deterioro en el manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los MLVs [69–71]. Más específicamente, en aortas de ratones C57BL/6J con obesidad inducida por dieta [71], así como en MLVs cultivados de aortas de ratas Zucker obesas [70], se observó un incremento en la oxidación de SERCA en la Cys614 y esta oxidación irreversible bloquea la S-glutacionilación de este residuo, disminuyendo la actividad de la bomba SERCA [71].

Adicionalmente, en ratas Wistar macho que recibieron una dieta alta en sal (4% NaCl durante seis semanas) se reportó una disminución en la expresión de SERCA2 y SERCA3 en homogenados de aorta, lo que disminuyó la respuesta contráctil a fenilefrina y a cafeína en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, y redujo el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares sin alterar la vasoconstricción inducida por despolarización con alto  $\text{K}^+$ , o por fenilefrina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo [72]. Los autores de este trabajo demostraron que la ingesta elevada de sal disminuye la expresión de la bomba SERCA en arterias, sin embargo, no proponen un mecanismo molecular que pueda explicarlo [72]. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que en arterias mesentéricas de rata tratadas por 24 horas con aldosterona induce el incremento en la expresión de la bomba SERCA, lo que nos permitió postular a la bomba SERCA como proteína clave en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia los reservorios localizados en el RS super-

ficial y un componente crítico en la modulación de la frecuencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y los STOCs que impactan directamente en la vaso-relajación [42].

Por último, con la idea de recuperar la actividad fisiológica de la bomba SERCA en las condiciones patológicas, se han estudiado fármacos con efectos benéficos en el sistema cardiovascular como el inhibidor del co-transportador de glucosa tipo 2, canagliflozina, que disminuye la hipercontractilidad vascular y la presión arterial en hipertensos. En aorta de conejo, se propuso que estos efectos benéficos son mediados por la bomba SERCA [73]. Al evaluar el posible mecanismo molecular de este fármaco, se encontró que la relajación de arterias inducida por canagliflozina involucra la activación de la bomba SERCA de la aorta, pero no la de arterias mesentéricas de resistencia, lo cual deja abierto esta área de investigación para más estudios.

## 8. Conclusiones

La evidencia experimental demuestra la importancia de la bomba SERCA en los MLVs en condiciones fisiológicas y en patologías asociadas a la disrupción en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito si la actividad o la distribución subcelular de las isoformas de la bomba SERCA de los MLVs de arterias de resistencia se modifica en patologías vasculares asociadas a la obesidad, la diabetes y la hipertensión. Estas enfermedades se han visto relacionadas con una mayor incidencia de COVID grave, por lo que consideramos que es muy importante estudiarlo.

## 9. Agradecimientos

Agradecemos el apoyo del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación de Conacyt (Proyecto Ciencia Básica 2017-2018 # A1-S-9082). También agradecemos el apoyo de la M. en C. Pamela Gaitan González en la elaboración de la figura 2 con el programa BioRender, y de la Lic. en Microbiól. Daniela Rodríguez Benito por las correcciones y comentarios al presente capítulo.

## Referencias

- [1] Widmaier EP, Raff H, Strang KT, Vander AJ. *Vander's human physiology: the mechanisms of body function*. 11th Editi. McGraw-Hill Higher Education (2008). 770 p.
- [2] Bozler E. Electric Stimulation and Conduction of Excitation in Smooth Muscle. *Am J Physiol* 1938; **122**:614–623.
- [3] Sharma V, Mcneill JH. The etiology of hypertension in the metabolic syndrome part three: the regulation and dysregulation of blood pressure. *Curr Vasc Pharmacol* 2006; **4**:305–20.
- [4] Christensen KL, Mulvany MJ. Location of resistance arteries. *J Vasc Res* 2001; **38**:1–12.
- [5] Brown IAM, Diederich L, Good ME, Leon J, Murphy SA, Cortese-krott MM, Hall JL, Le H, Isakson BE. Vascular Smooth

Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension: VSMC in hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; **38**:1969–1985.

[6] Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr Physiol* 2017; **7**:485–581.

[7] Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science (80- )* 1995; **270**:633–637.

[8] Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev* 2000; **1**:11–21.

[9] Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* 2006; **21**:69–78.

[10] Orallo F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacol Ther* 1996; **69**:153–171.

[11] Miranda-Saturnino MJ. Caracterización y análisis de recuperación de las señales locales de Ca<sup>2+</sup> en células de músculo liso vascular de ratas hipertiroideas. Cinvestav-IPN (2013). 85 p.

[12] Chemaly ER, Troncione L, Lebeche D. SERCA control of cell death and survival. *Cell Calcium* 2018; **69**:46–61.

[13] Fernández-Velasco M, Ruiz-Hurtado G, Gómez AM, Rueda A. Ca<sup>2+</sup> handling alterations and vascular dysfunction in diabetes. *Cell Calcium* 2014; **56**:397–407.

[14] Amberg GC, Navedo MF. Calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Microcirculation* 2013; **20**:281–9.

[15] Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* 2002; **90**:248–250.

[16] Somlyo AP. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ Res* 1985; **57**:497–507.

[17] Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, Camargo LL, Anagnostopoulou A, Arner A, Montezano AC. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res* 2018; **114**:529–539.

[18] Goulopoulou S, Webb RC. The symphony of vascular contraction: How smooth muscle cells lose harmony to signal increased vascular resistance in hypertension. *Hypertension* 2014; **63**:e33–e39.

[19] Jaggar JH, Porter VA, Jonathan Lederer W, Nelson MT. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2000; **278**:C235–C256.

[20] Essin K, Gollasch M. Role of ryanodine receptor subtypes in initiation and formation of calcium sparks in arterial smooth muscle: comparison with striated muscle. *J Biomed Biotechnol* 2009; **2009**:135249.

[21] Benham CD, Bolton TB. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J Physiol* 1986; **381**:385–406.

[22] Bolton TB, Gordienko D V. Confocal imaging of calcium release events in single smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand* 1998; **164**:567–75.

[23] Vaithianathan T, Narayanan D, Asuncion-Chin MT, Jeyakumar LH, Liu J, Fleischer S, Jaggar JH, Dopico AM. Subtype identification and functional characterization of ryanodine receptors in rat cerebral artery myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; **299**:C264–C278.

[24] Ji G, Feldman ME, Greene KS, Sorrentino V, Xin H, Kotlikoff MI. RYR2 Proteins Contribute to the Formation of Ca<sup>2+</sup> Sparks in Smooth Muscle. *J Gen Physiol* 2004; **123**:377–386.

[25] Rueda A, Song M, Toro L, Stefani E, Valdivia HH. Sorcin modulation of Ca<sup>2+</sup> sparks in rat vascular smooth muscle cells. *J Physiol* 2006; **576**:887–901.

[26] Wang Y-X, Zheng Y-M, Mei Q-B, Wang Q-S, Collier ML, Fleischer S, Xin H-B, Kotlikoff MI. FKBP12.6 and cADPR regulation of Ca<sup>2+</sup> release in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; **286**:C538–46.

[27] Porter VA, Bonev AD, Knot HJ, Heppner TJ, Stevenson AS, Kleppisch T, Lederer WJ, Nelson MT. Frequency modulation of Ca<sup>2+</sup> sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol - Cell Physiol* 1998; **274**:C1346–C1355.

[28] Bonev AD, Jaggar JH, Rubart M, Nelson MT. Activators of protein kinase C decrease Ca<sup>2+</sup> spark frequency in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol* 1997; **273**:C2090–5.

[29] Jaggar JH, Wellman GC, Heppner TJ, Porter VA, Perez GJ, Gollasch M, Kleppisch T, Rubart M, Stevenson AS, Lederer WJ, et al. Ca<sup>2+</sup> channels, ryanodine receptors and Ca<sup>(2+)</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta Physiol Scand* 1998; **164**:577–87.

[30] Knot HJ, Standen NB, Nelson MT. Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall [Ca<sup>2+</sup>] in cerebral arteries of rat via Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. *J Physiol* 1998; **508**:1:211–221.

[31] Zhuge R, Tuft RA, Fogarty KE, Bellve K, Fay FS, Walsh J V. The Influence of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Concentration on Ca<sup>2+</sup> Sparks and Spontaneous Transient Outward Currents in Single Smooth Muscle Cells. *J Gen Physiol* 1999; **113**:215–228.

[32] Wellman GC, Santana LF, Bonev AD, Nelson MT. Role of phospholamban in the modulation of arterial Ca<sup>2+</sup> sparks and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by cAMP. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2001; **281**:1029–1037.

[33] Jaggar JH, Stevenson A, Nelson MT. Voltage dependence of Ca<sup>2+</sup> sparks in intact cerebral arteries. *Am J Physiol* 1998; **274**:C1755–C1761.

[34] Devine CE, Somlyo A V, Somlyo AP. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J Cell Biol* 1972; **52**:690–718.

[35] Rembold CM, Chen XL. The buffer barrier hypothesis, [Ca<sup>2+</sup>] (i) homogeneity, and sarcoplasmic reticulum function in swine carotid artery. *J Physiol* 1998; **513**:477–492.

[36] Van Breemen C. Calcium requirement for activation of intact aortic smooth muscle. *J Physiol* 1977; **272**:317–329.

[37] Evans AM, Fameli N, Ogunbayo OA, Duan J, Navarro-Dorado J. From contraction to gene expression: nanojunctions of the sarco/endoplasmic reticulum deliver site- and function-specific calcium signals. *Sci China Life Sci* 2016; **59**:749–763.

[38] Van Breemen C, Fameli N, Evans AM. Pan-junctional sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: Nanospace Ca<sup>2+</sup> transport for site- and function-specific Ca<sup>2+</sup> signalling. *J Physiol* 2013; **591**:2043–2054.

[39] Chen Q, van Breemen C. The superficial buffer barrier in venous smooth muscle: sarcoplasmic reticulum refilling and unloading. *Br J Pharmacol* 1993; **109**:336–343.

- [40] Casteels R, Droogmans G. Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *J Physiol* 1981; **317**:263–279.
- [41] Evans AM. *Nanojunctions of the Sarcoplasmic Reticulum Deliver Site- and Function-Specific Calcium Signaling in Vascular Smooth Muscles*. 1st ed. Elsevier Inc. (2017). 1–47 p.
- [42] Salazar-Enciso R, Guerrero-Hernández A, Gómez AM, Benitah JP, Rueda A. Aldosterone-Induced Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Pump Upregulation Counterbalances Cav1.2-Mediated Ca<sup>2+</sup> Influx in Mesenteric Arteries. *Front Physiol* 2022; **13**:834220.
- [43] Toyoshima C. How Ca<sup>2+</sup>-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2009; **1793**:941–946.
- [44] Kabashima Y, Ogawa H, Nakajima R, Toyoshima C. What ATP binding does to the Ca<sup>2+</sup> pump and how nonproductive phosphoryl transfer is prevented in the absence of Ca<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; **117**:18448–18458.
- [45] Lipskaia L, Hadri L, Lopez J, Hajjar RJ, Bobe R. Benefit of SERCA2a Gene Transfer to Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells: A New Aspect in Therapy of Cardiovascular Diseases. *Curr Vasc Pharmacol* 2013; **11**:465–479.
- [46] Xu H, Van Remmen H. The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) pump: a potential target for intervention in aging and skeletal muscle pathologies. *Skelet Muscle* 2021; **11**:1–9.
- [47] Zhang Y, Inoue M, Tsutsumi A, Watanabe S, Nishizawa T, Nagata K, Kikkawa M, Inaba K. Cryo-EM structures of SERCA2b reveal the mechanism of regulation by the luminal extension tail. *Sci Adv* 2020; **6**:1–11.
- [48] Olesen C, Sørensen TLM, Nielsen RC, Møller JV, Nissen P. Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. *Science (80- )* 2004; **306**:2251–2255.
- [49] Olesen C, Picard M, Winther AML, Gyruup C, Morth JP, Oxvig C, Møller JV, Nissen P. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* 2007; **450**:1036–1042.
- [50] Fransen P, Chen J, Vangheluwe P, Guns PJ. Contractile Behavior of Mouse Aorta Depends on SERCA2 Isoform Distribution: Effects of Replacing SERCA2a by SERCA2b. *Front Physiol* 2020; **11**:1–13.
- [51] Inoue M, Sakuta N, Watanabe S, Zhang Y, Yoshikaie K, Tanaka Y, Ushioda R, Kato Y, Takagi J, Tsukazaki T, et al. Structural Basis of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> -ATPase 2b Regulation via Transmembrane Helix Interplay. *Cell Rep* 2019; **27**:1221–1230.
- [52] Vandecaetsbeek I, Trekels M, De Maeyer M, Ceulemans H, Lescrinier E, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P. Structural basis for the high Ca<sup>2+</sup> affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca<sup>2+</sup> pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**:18533–18538.
- [53] Sitsel A, Raeymaecker J De, Drachmann ND, Derua R, Smaardijk S, Andersen JL, Vandecaetsbeek I, Chen J, Maeyer M De, Waelkens E, et al. Structures of the heart specific SERCA2a Ca<sup>2+</sup>ATPase. *EMBO J* 2019; **38**:e100020.
- [54] Zhang Y, Kobayashi C, Cai X, Watanabe S, Tsutsumi A, Kikkawa M, Sugita Y, Inaba K. Multiple sub-state structures of SERCA2b reveal conformational overlap at transition steps during the catalytic cycle. *Cell Rep* 2022; **41**:111760.
- [55] Wu KD, Bungard D, Lytton J. Regulation of SERCA Ca<sup>2+</sup> pump expression by cytoplasmic [Ca<sup>2+</sup>] in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2001; **280**:843–851.
- [56] Levitsky D, Clergue M, Lambert F, Souponitskayas V, Jemtelf TH Le, Lecarpentier Y, Lomprell A-M. Sarcoplasmic Reticulum Calcium Transport and Ca<sup>2+</sup> -ATPase Gene Expression in Thoracic and Abdominal Aortas of Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *J Biol Chem* 1993; **268**:8325–8331.
- [57] Searls YM, Loganathan R, Smirnova I V., Stehno-Bittel L. Intracellular Ca<sup>2+</sup>regulating proteins in vascular smooth muscle cells are altered with type 1 diabetes due to the direct effects of hyperglycemia. *Cardiovasc Diabetol* 2010; **9**:1–17.
- [58] Clark JH, Kinnear NP, Kalujnaia S, Cramb G, Fleischer S, Jeyakumar LH, Wuytack F, Evans AM. Identification of functionally segregated sarcoplasmic reticulum calcium stores in pulmonary arterial smooth muscle. *J Biol Chem* 2010; **285**:13542–13549.
- [59] Lagaud GJ, Randriamboavonjy V, Roul G, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of Ca<sup>2+</sup> release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. *Am J Physiol* 1999; **276**:H300-8.
- [60] Jang SP, Oh JG, Kang DH, Kang JY, Kang SW, Hajjar RJ, Park WJ. A Decoy Peptide Targeted to Protein Phosphatase 1 Attenuates Degradation of SERCA2a in Vascular Smooth Muscle Cells. *PLoS One* 2016; **11**:e0165569.
- [61] Lipskaia L, Hadri L, Le Prince P, B E, Atassi F, Liang L, Glorian M, Limon I, Lompre A, Lehoux S, et al. SERCA2a gene transfer prevents intimal proliferation in an organ culture of human internal mammary artery. *Gene Ther* 2013; **20**:396–406.
- [62] Miranda-Saturnino MJ, de Alba-Aguayo DR, Mercado-Morales M, Guerrero-Hernández A, Rueda A. Increased Serca Pump Expression is Associated with Slow Termination of Calcium Sparks and Delayed Local Recovery in Vascular Smooth Muscle Cells of Hyperthyroid Rats. *Biophys J* 2014; **106**:321a.
- [63] Shaikh SA, Sahoo SK, Periasamy M. Phospholamban and sarcolipin: Are they functionally redundant or distinct regulators of the Sarco(Endo)Plasmic Reticulum Calcium ATPase? *J Mol Cell Cardiol* 2016; **91**:81–91.
- [64] Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, Cohen RA. S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med* 2004; **10**:1200–1207.
- [65] Monteith GR, Kable EPW, Kuo TH, Roufogalis BD. Elevated plasma membrane and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump mRNA levels in cultured aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **230**:344–346.
- [66] Zulian A, Baryshnikov SG, Linde CI, Hamlyn JM, Ferrari P, Golovina VA. Upregulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and TRPC6 contributes to abnormal Ca<sup>2+</sup> homeostasis in arterial smooth muscle cells from Milan hypertensive rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 2010; **299**:
- [67] Hill BJE, Price EM, Dixon JL, Sturek M. Increased calcium buffering in coronary smooth muscle cells from diabetic dyslipidemic pigs. *Atherosclerosis* 2003; **167**:15–23.
- [68] Witczak CA, Wamhoff BR, Sturek M. Exercise training prevents Ca<sup>2+</sup> dysregulation in coronary smooth muscle from diabetic dyslipidemic yucatan swine. *J Appl Physiol* 2006; **101**:752–762.

- [69] Climent B, Santiago E, Sánchez A, Muñoz-Picos M, Pérez-Vizcaíno F, García-Sacristán A, Rivera L, Prieto D. Metabolic syndrome inhibits store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry and calcium-induced calcium-release mechanism in coronary artery smooth muscle. *Biochem Pharmacol* 2020; **182**:114222.
- [70] Tong XY, Hou X, Jourdeuil D, Weisbrod RM, Cohen RA. Upregulation of Nox4 by TGF $\beta$ 1 Oxidizes SERCA and Inhibits NO in Arterial Smooth Muscle of the Prediabetic Zucker Rat. *Circ Res* 2010; **107**:975–983.
- [71] Qin Z, Hou X, Weisbrod RM, Seta F, Cohen RA, Tong X. Nox2 mediates high fat high sucrose diet-induced nitric oxid edysfunction and inflammation in aortic smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 2014; **72**:56–63.
- [72] Crestani S, Webb RC, Da Silva-Santos JE. High-salt intake augments the activity of the RhoA/ROCK pathway and reduces intracellular calcium in arteries from rats. *Am J Hypertens* 2017; **30**:389–399.
- [73] Seo MS, An JR, Kang M, Heo R, Park H, Han ET, Han JH, Chun W, Park WS. Mechanisms underlying the vasodilatory effects of canagliflozin in the rabbit thoracic aorta: Involvement of the SERCA pump and Kv channels. *Life Sci* 2021; **287**:120101.

### CRISTIAN JULIAN ARRIERO CARRILLO

Maestro en ciencias es estudiante del doctorado en el Departamento de Bioquímica del Cinvestav

### ROGELIO SALAZAR ENCISO

Obtuvo su maestría y doctorado en el Departamento de Bioquímica del Cinvestav-IPN y actualmente se desempeña como perito en genética en el Departamento de Genética de la Fiscalía General de la República Mexicana.

### ANGÉLICA RUEDA Y SÁNCHEZ DE LA VEGA

Es investigadora titular del Departamento de Bioquímica del Cinvestav-IPN (en la Unidad Zacatenco, de la Ciudad de México) desde noviembre del 2008 hasta la fecha. Es bióloga (egresada de la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla). Estudió su maestría y doctorado en el Departamento de Bioquímica del Cinvestav-IPN. Durante su estancia posdoctoral con el Dr. Héctor H. Valdivia (en la Universidad de Wisconsin-Madison, USA), fue becaria de la American Heart Association, estudiando el efecto de sorcina en la dinámica de calcio intracelular y la regulación de los receptores de rianodina cardiacos y vasculares. Del 2006 al 2007, realizó una segunda estancia posdoctoral (en la Unidad 637 INSERM, en Montpellier, Francia) estudiando las alteraciones en la dinámica del calcio intracelular en arterias cerebrales de ratones con diabetes *mellitus* tipo II. Cuenta con 36 artículos en revistas indexadas, 8 publicaciones nacionales arbitradas, dos capítulos en libros, fue editora en *Frontiers in Physiology* de un Special Topic y de un libro electrónico. Ha graduado a 4 estudiantes de licenciatura, doce de maestría (dos en co-tutoría) y 5 de doctorado (una en co-tutoría) y pertenece al SNI (nivel I) desde 2008. Sus proyectos han recibido financiamiento de ECOS-NORD Francia, Conacyt, Fondo SEP-Cinvestav, Fundación Miguel Alemán A. C., y del Instituto de Ciencia y Tecnología de CDMX. En el 2010 recibió el premio Dr. Jorge Rosenkranz, otorgado por Roche de México. En el 2016 recibió una beca de COMEXUS Fubright-García Robles para una estancia de investigación en la Universidad de Michigan, en Ann Arbor, MI, USA y actualmente continúa estudiando las alteraciones que presentan el receptor de rianodina y la bomba SERCA en miocitos lisos y cardíacos en enfermedades metabólicas. La doctora Rueda también imparte clases en los posgrados de los Departamentos de Bioquímica y Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav, desde 2009.



Cristian J. Arriero Carrillo, Angélica Rueda y Rogelio Salazar Enciso.

**Nuevas tendencias de investigación en la señalización  
celular en la era post-COVID**  
se terminó de editar en el mes de septiembre  
de 2023 en la Ciudad de México.

