

Transporte de vitamina B₁₂ Un laberinto de una única entrada y múltiples caminos incompletos

Transport of Vitamina-B12. A labyrinth
of a single entry and multiple incomplete roads

Alberto Lazarowski

Hematología-INFIBIOC- FF y B - UBA- CABA
Fundación Investigar - Argenomics - CABA

alazarowski@gmail.com



Macroцитosis:
¿ en que debemos pensar?

HEMATOLOGÍA, Vol 19: 208 - 221
Número Extraordinario
XXII CONGRESO
Octubre 2015

Palabras clave: Vit-B12,
Transcobalamina,
Cubulina,
Megalina,
CD320,
MRP1.

Keywords: Vit-B12,
trascobalamin,
Cubilin,
Megalina,
CD320,
MRP1.

Introducción

La vitamina B₁₂ (también conocida como cobalamina) es una molécula soluble en agua que funciona como una coenzima esencial para dos enzimas en nuestro organismo: la metionina sintetasa citoplasmática, que cataliza la metilación de la Homocisteína y su conversión en Metionina; y la enzima metilmalonil-CoA mutasa reductasa, que cataliza la conversión de metilmalonil-CoA en succinil-CoA en la mitocondria (**Figura 1**). La primera de las enzimas, está directamente involucrada en el metabolismo del Acido Fólico (también conocida como Vitamina B₉), y es el paso limitante en el proceso de transferencia de unidades monocarbonadas produciendo Metionina, aminoácido fundamental en el inicio de la síntesis proteica, y la transformación de Uridina en Timidina, como paso clave en la síntesis

de DNA. Estos procesos de transferencia de grupos mococarbonados y sus desequilibrios, fueron debidamente revisados en el Libro del Programa Educativo del XX Congreso SAH del año 2011. La segunda de las reacciones enzimáticas de la Vit-B₁₂ (metilmalonil-CoA mutasa), está implicada en reacciones de digestión de diferentes compuestos orgánicos, incluyendo los aminoácidos ramificados y ácidos grasos de cadena impar. A nivel mundial, la deficiencia moderada de vitamina B₁₂ es bastante común, especialmente en las naciones en vías de desarrollo en las que las personas tienen una baja o limitada ingesta de productos de origen animal (la única fuente de la vitamina)⁽¹⁾.

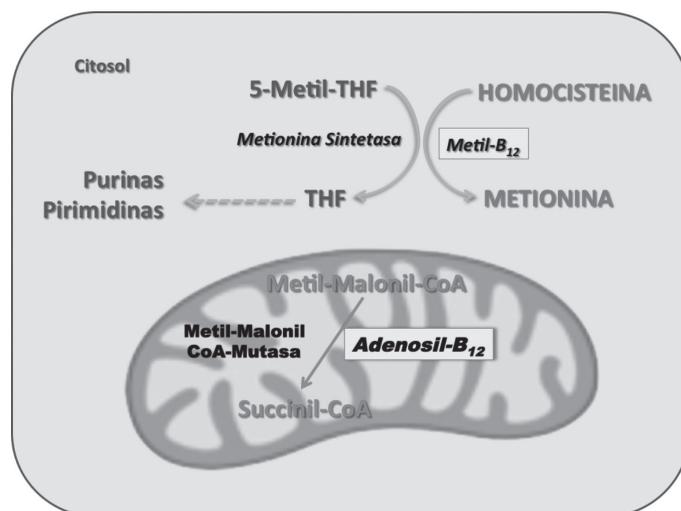
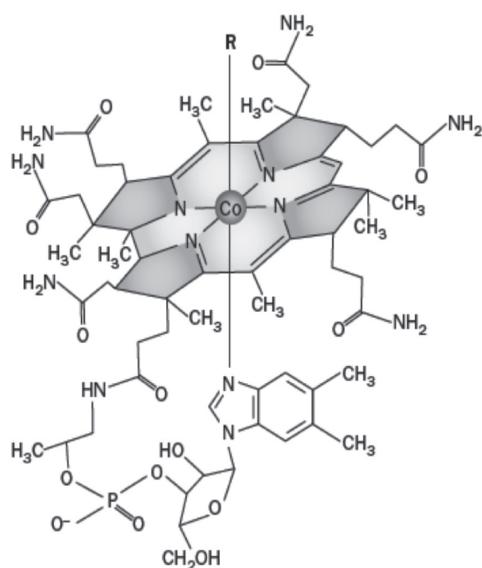


Figura 1: Estructura de la Vit-B₁₂, caracterizada por anillos tetrapirrólicos que protegen una molécula de Cobalto. De allí el nombre de **Cobalaminas**. Dicho metal pesado será la base de unión de diferentes grupos que permitirán generar Cobalaminas (funcionales y no funcionales), dependiendo del grupo R unido al Cobalto. Localización citoplasmática de la Metil-B₁₂ y mitocondrial de la Adenosil-B₁₂.

En tanto, la deficiencia moderada de Vit-B₁₂ también es común entre la población de edad avanzada, posiblemente debido a cambios en el epitelio gástrico dependientes de la edad, que provocan la incapacidad para absorber eficazmente la Vit-B₁₂ presente en los alimentos⁽²⁾. Típicamente, la deficiencia de Vit-B₁₂ se produce con mayor frecuencia como resultado de la falla en la absorción de la vitamina, generando en una enfermedad grave caracterizada por anemia megaloblástica y/o trastornos neurológicos, , progresan con un deterioro irreversible y finalmente con la muerte del paciente⁽³⁾. El proceso metabólico de síntesis de las *cobalaminas*, consta de alrededor de 30 pasos enzimáticos, una tarea sumamente laboriosa, que los seres humanos (y los mamíferos en general) nos hemos ahorrado de realizar, y le dejamos esa tarea a los microorganismos (bacterias). Por tal motivo, no somos capaces de sintetizar las múltiples diferentes “*Cobalaminas*”, por lo cual, somos totalmente dependientes de su adquisición dietaria⁽⁴⁾. De esta forma, la ingesta y la absorción a nivel ileal resulta el paso limitante para el aporte de la Vit-B₁₂ a todas las células del organismo. Debido a la eficiente circulación enterohepática, así como su recaptura renal, la Vit-B₁₂ se retiene en el cuerpo durante largos períodos de tiempo, y por lo

tanto una insuficiente ingesta alimentaria puede tardar varios años (en individuos adultos) para causar síntomas clínicos relacionados a dicha deficiencia. Por el contrario, la deficiencia puede ocurrir mucho más rápido durante edades tempranas y en pacientes que carecen de la capacidad de absorción de la vitamina. En ausencia de limitaciones dietarias en el aporte nutricional de la Vit-B₁₂, su deficiencia será principalmente consecuencia de la destrucción autoinmune de las células parietales gástricas, lo que genera la “*Anemia Perniciosa*” clásica. Sin embargo, otros mecanismos menos frecuentes de condiciones adquiridas o genéticas, también pueden resultar en la falta de la vitamina, incluyendo defectos moleculares en la compleja maquinaria de la absorción intestinal de la vitamina.

La absorción de Vit-B₁₂ y su posterior distribución en el cuerpo está mediada por un complejo de proteínas transportadoras y/o receptores-transportadores que translocan la Vit-B₁₂ del exterior celular al citoplasma, de allí hacia las organelas, de éstas nuevamente al citoplasma y finalmente al exterior celular. Este complejo sistema permite describir la ruta que la Vit-B₁₂ transitará desde los alimentos hasta llegar a las diferentes células del cuerpo.

Tabla 1: Listado de proteínas relacionadas a la absorción, transporte y metabolismo de las Cobalaminas

Proteína	Función (comprobada o propuesta)	Sitio de acción
Factor Intrínseco (FI)	Une Vit-B ₁₂	Intestino delgado
Cubilina (CUBN)	Unión al complejo Vit-B ₁₂ -FI	Superficie apical de las células epiteliales del borde en cepillo en el íleon terminal
AMN (AMN)	Internalización del complejo CUBN-FI-Vit-B ₁₂	Superficie apical de las células epiteliales del borde en cepillo en el íleon terminal
Transcobalamina II (TC-II)	Unión de Vit-B ₁₂	Plasma
Cobalamina A (MMAA)	Asegura la unión de Ado-B ₁₂ con MMCo-A mutasa	Mitocondria
Cobalamina B (MMAB)	Catalisa el acople de la adenosina	Mitocondria
Cobalamin C (MMACHC)	Catalisa la pérdida de los grupos CN y Alquilos de la CN y Alkil Cobalam.	Citosol
Cobalamin D (MMADHC)	Capta la Vit-B ₁₂ intracelular y la lleva al citosol o a la mitocondria	Citosol
Cobalamin E (MTRR)	Cataliza la metilación de la Vit-B ₁₂	Citosol
Cobalamina F/LMBD1	Transporta Vit-B ₁₂ del lisosoma al citosol	Membrana Lisosomal
Cobalamina G/ Metionina sintetasa	Catalisa metilación de Homocisteína	Citosol
Metilmalonil-CoA mutasa	Convierte MM-CoA en Succinil-CoA	Mitocondria
CD320	Une el complejo TC-II-B ₁₂	Membrana plasmática

Transportadores Vit-B₁₂ en los fluidos extracelulares

El acceso de la Vit-B₁₂ a los fluidos extracelulares depende de tres proteínas transportadoras homólogas: el *factor intrínseco (FI)*, la *transcobalamina*, también conocida como *transcobalamina II (TC-II)*, y la *haptocorrina*, también conocida como la *Proteína-R*. Estas tres proteínas comparten el mismo esquema estructural global, se expresan en sitios específicos del tracto gastrointestinal y cada una de ellas sólo puede llevar una sola molécula Vit-B₁₂ (**Figura 2**).

Al alcanzar el duodeno, la haptocorrina (Proteína R), es degradada por enzimas proteolíticas pancreáticas, y la Vit-B₁₂ es captada por el factor intrínseco (FI), secretado por las células parietales gástricas de la mucosa de la pared gástrica. En el íleon terminal, la Vit-B₁₂ unida al FI (FI-Vit-B₁₂) se internaliza por endocitosis mediada por la acción de un receptor formado por el macrocomplejo *Cubilina-AMN* (**Figura 3**). En el interior del enterocito ileal, el FI

se degrada y la Vit-B₁₂ se transfiere por acción del ABC-transportador MRP1, desde el lado basolateral de la célula hacia el plasma (circulación). Allí, la Vit-B₁₂ estará principalmente unida a la Transcobalamina-II (TC-II). Este último transportador es responsable de la entrega de la Vit-B₁₂ a todas las células de los tejidos. En el hígado y otros órganos, la captación celular de Vit-B₁₂ unida a la TC-II está mediada por el receptor CD320, mientras que el receptor Megalina, es responsable de la reabsorción renal del complejo. En este órgano, la reabsorción tubular de la Vit-B₁₂ es mediada por el complejo receptor Cubilina/AMN, el cual no reconoce al FI sin vitamina, ni a la Vit-B₁₂ libre⁽⁵⁾ (**Figuras 2 y 5**).

Debido al papel fundamental del factor intrínseco en la absorción de Vit-B₁₂, la deficiencia del FI (causada por el ataque autoinmune a las células parietales o raros errores congénitos de su síntesis), conduce a un cuadro grave de déficit de Vit-B₁₂ con anemia (megaloblástica) “perniciosa clásica”⁽⁶⁾. El factor intrínseco fue descrito con dicho nombre por Castle

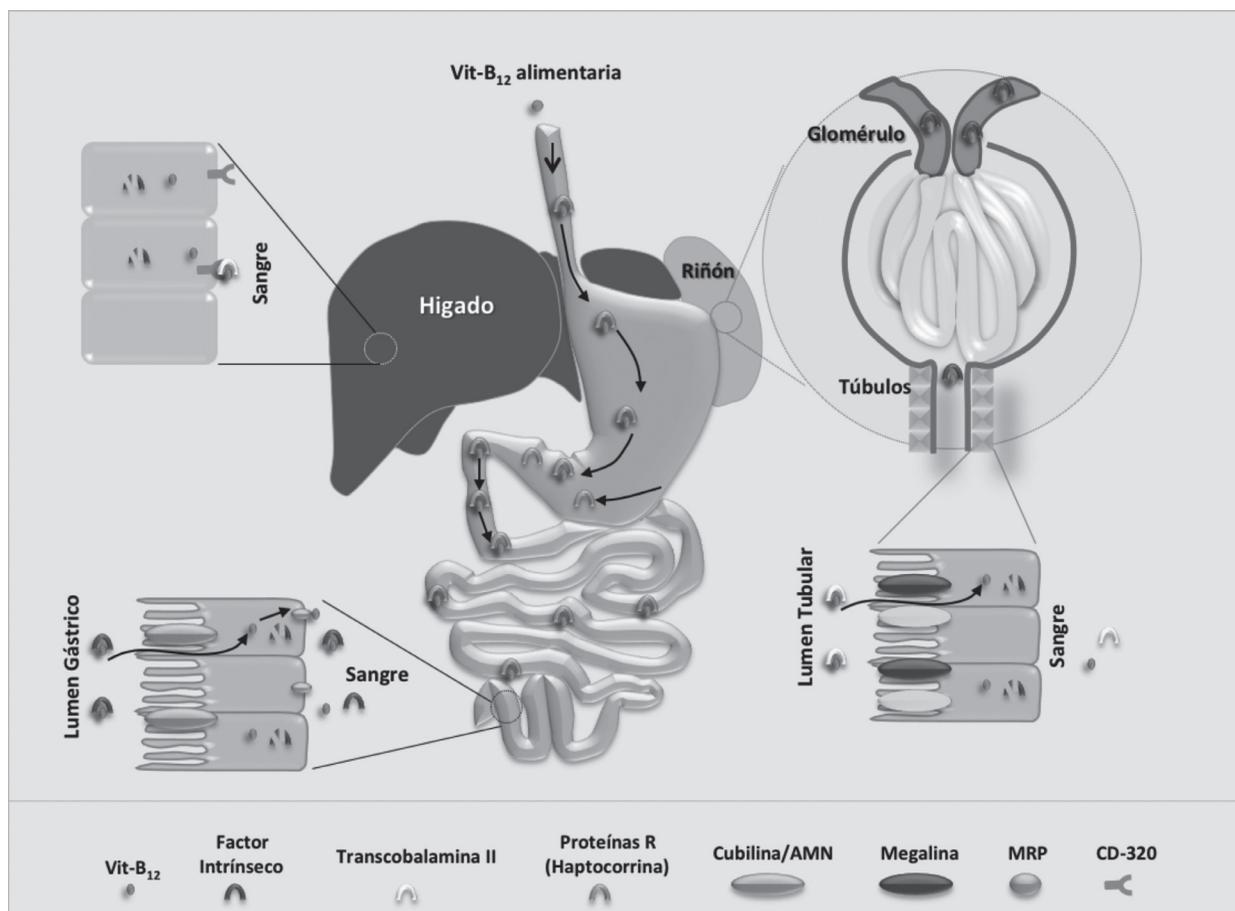


Figura 2: Vista general esquemática de la captación y transporte de la vitamina B₁₂ en seres humanos. En el tracto gastrointestinal superior la Vit-B₁₂ se libera de los alimentos y es captada por las proteínas R (haptocorrinas), presentes en los fluidos salivales y gástricos.

en 1935, como el “factor intrínseco” que estaba ausente en pacientes que sufren de lo que él denominó como anemia perniciosa, dado que no mejoraban a pesar del suministro oral de Vit-B₁₂, a la que consideró como el “factor extrínseco”⁽⁷⁾, que sí corregía la anemia en aquellos pacientes con déficit carenciales (nutricionales).

La importancia de la transcobalamina-II (TC-II) circulante en el plasma, para el transporte y biodistribución de la Vit-B₁₂ absorbida en el íleon, es puesta de manifiesto por las graves consecuencias clínicas observadas en casos pediátricos con severa deficiencia congénita en dicho transportador. Los niños afectados muestran pocos síntomas al nacer, pero en cuestión de meses desarrollan una deficiencia de Vit-B₁₂ severa que conduce a daño neurológico grave y megaloblastosis refractaria a todo tipo de tratamiento⁽⁸⁾.

Diferentes tipos de mutaciones conducen a una falta

de TC-II, incluyendo deleciones y mutaciones que resultan en la transcripción de un ARNm erróneo⁽⁹⁾. Teniendo en cuenta el importantísimo rol biodistribuidor que tiene la TC-II, la cantidad de complejo TC-II-Vit-B₁₂ conocido como Holo-transcobalamina, resulta ser un parámetro fidedigno de la cantidad de Vit-B₁₂ utilizable en un individuo⁽¹⁰⁾. Actualmente, la medición de los niveles de holo-transcobalamina en plasma, se considera un valioso complemento de las clásicas pruebas de diagnóstico que evalúan la posible deficiencia de Vit-B₁₂, como la medida de los niveles de Vit-B₁₂ en plasma, o de homocisteína y/o ácido metilmalónico, ambos de los cuales se acumulan en los pacientes afectados.

Parámetros sanguíneos relacionados a deficiencia de Vit-B₁₂

- ✓ Disminución de las concentraciones de Vit-B₁₂ en plasma

- ✓ Incremento de los niveles de ácido metilmalónico en plasma
- ✓ Incremento de los niveles de homocisteína en plasma (también en Deficiencia de B₆ y Ac. Fólico)
- ✓ Disminución de las concentraciones de holo-transcobalamina en plasma

Absorción de la vitamina B₁₂ en el intestino

Durante la ingesta de alimentos, en el tracto gastrointestinal superior la Vit-B₁₂ es captada por las proteínas R (haptocorrinas), y este mecanismo se piensa que protege a la vitamina de la hidrólisis por el entorno ácido en el estómago. En el duodeno, la haptocorrina es degradada por enzimas secretadas por el páncreas (exócrino) y la vitamina liberada es entonces captada por el FI, que es resistente al ataque proteolítico de estas enzimas⁽¹¹⁾. En el íleon terminal el complejo FI-Vit-B₁₂ es absorbido por endocitosis mediada por el receptor formado por el complejo Cubilina-AMN o complejo CUBAM⁽¹²⁾. El complejo **CUBAM** consta de dos moléculas colaboradoras: la Cubilina (que es una proteína de membrana periférica que se une al complejo FI-B₁₂), y la estructura denominada AMN (amniotless), que es una proteína transmembrana con actividad endocítica. La Cubilina (460 kDa) y el AMN (48 kDa) se coexpresan en la membrana apical de los epitelios de absorción tales como el íleon, los túbulos proximales del riñón, y el saco vitelino visceral (**Figura 3**). La importancia fisiológica del complejo **CUBAM** se basa en estudios bioquímicos que muestran la dependencia mutua entre Cubilina y AMN para el procesamiento del complejo **CUBAM**, y por los estudios genéticos del Síndrome de Imerslund-Grasbeck (IGS), un raro trastorno juvenil, producido por un defecto congénito de absorción intestinal de la Vit-B₁₂, y que conduce a una anemia megaloblástica de tipo autosómica recesiva (MGA1)⁽¹³⁾. Esta entidad clínica se caracteriza por mutaciones en los genes que codifican tanto a la Cubilina como al AMN^(14,15). Dichas mutaciones comprometen el sitio de unión o reconocimiento del EGF (amniotless binding domains) o del complejo FI-Vit-B₁₂, y fueron descritas en regiones exónicas (1-28) del gen de la Cubilina, o en clusters intrónicos (8-11) o en el exón 10, del gen AMN (**Figura 3**). Además de la anemia megaloblástica y/o síntomas

neurológicos, el Síndrome de Imerslund-Grasbeck es resistente al tratamiento con Vit-B₁₂ y a menudo se acompañada por proteinuria pronunciada, que se explica por una función adicional de **CUBAM** en la reabsorción renal de proteínas filtradas tales como albúmina, apolipoproteína A-I y transferrina. Los pacientes con IGS sin proteinuria pueden explicarse por mutaciones que afectan solamente la unión FI-Vit-B₁₂. Un ejemplo de tal mutación en el gen CUBN es la denominada mutación finlandesa 1 (FM1) *c.3890C>T; p.Pro1297Leu*, una mutación que se encuentra en la mayoría de los casos IGS detectados en Finlandia⁽¹⁶⁾. En estos casos, el cuadro clínico se asemeja a la deficiencia de Vit-B₁₂ juvenil hereditaria causada por mutaciones en el gen que codifica el factor intrínseco⁽⁶⁾.

El transporte celular de la Vit-B₁₂

Tras la internalización mediada por el complejo **CUBAM-FI-Vit-B₁₂**, el factor intrínseco se degrada en el lisosoma, por acción de proteasas que, a diferencia de las proteasas intestinales, sí pueden atacar a esta proteína. La Vit-B₁₂ liberada atraviesa la membrana lisosomal para acceder al citoplasma, un proceso que requiere la acción de la proteína LMBD1. En cualquier caso, las mutaciones en el gen que codifica LMBD1 son responsables del raro defecto denominado Cbl-F, un error innato del metabolismo de la Vit-B₁₂ que se caracteriza por una liberación lisosomal defectuosa de la vitamina. La acumulación de Vit-B₁₂ dentro del lisosoma dificulta su disponibilidad y uso por las enzimas *metionina sintetasa* y *metilmalonil-CoA mutasa*. LMBD1 es una proteína similar al receptor de lipocalina (61 kDa) que se localiza en la membrana lisosomal, con el C-terminal ubicado hacia el citoplasma. La transfección del ADNc que codifica el tipo salvaje de LMBD1 a cultivos celulares de fibroblastos de pacientes con síndrome de Cbl-F, resulta en un incremento sustancial en la utilización enzimática de la Vit-B₁₂. En conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que LMBD1 está implicado en la exportación lisosomal de Vit-B₁₂.

Exactamente cómo la Vit-B₁₂ se maneja dentro de la célula desde el punto de salida lisosomal hasta su uso como una coenzima, o su exportación hacia el exterior celular, sigue siendo en gran parte desconocido. Sin embargo, ya podemos afirmar que muta-

ciones en al menos ocho genes, son responsables de los errores congénitos en el metabolismo de Vit-B₁₂, relacionados al tránsito intracelular de la vitamina (Tabla 1). Dependiendo de la ubicación intracelular de la Vit-B₁₂, los defectos pueden bloquear la producción o utilización de Metil-B₁₂, Adenosil-B₁₂, o ambos compuestos, lo que resulta en homocistinuria, aciduria metilmalónica, o ambos. La llamada Cobalamina C, convierte la Ciano-cobalamina y la Alquil-cobalamina, en compuestos listos para recibir sus uniones covalentes con el metilo (a nivel citoplasmático) o la adenosina (a nivel mitocondrial), tarea que estará a cargo del complejo denominado Cobalamina D.

Los detalles exactos del transporte proteico de la Vit-B₁₂ dentro de la célula todavía están inconclusos. Sin embargo, se sabe que la vitamina puede permanecer dentro de la célula para ser utilizada como cofactor enzimático, o puede ser exportada por el transportador basolateral MRP-1, hacia afuera de la célula ileal. MRP-1 (multidrug resistant protein 1) perteneciente a la gran familia de transportadores-ABC (ATP-Binding Cassette) que funcionan a expensas de la hidrólisis de ATP. Parte de esta familia de transportadores es responsable del fenómeno clínico de multirresistencia a drogas (MDR). Se ha postulado que también podría existir un mecanismo de exportación alternativo de la Vit-B₁₂, quizás mediado por otros transportadores similares, o por mecanismos aún no dilucidados, pero se trataría de mecanismos indispensables en células polarizadas, es decir que deben asegurar un flujo unidireccional en el tránsito de la Vit-B₁₂.

En tanto, en las células no polarizadas, la internalización de Vit-B₁₂ se produce mediante un complejo con la TC-II, a través del receptor CD320. La fracción Vit-B₁₂ que ingresa a la mitocondria es modificada por el complejo proteico Cobalamina-B, y que permite generar el cofactor activo 5'-deoxyadenosil-cobalamina, que luego se utiliza por la enzima Metilmalonil-CoA mutasa (MUT)(Figura 4).

La fracción restante (citoplasmática) se orientará hacia la segunda de las dos enzimas dependientes de Vit-B₁₂, la *metionina sintetasa* (también denominada complejo de Cobalamina-G). Se cree que el complejo proteico Cobalamina-E se encarga de catalizar la generación de Metil-cobalamina, la forma activa del cofactor que es utilizado por la metionina sintetasa. En este punto, es importante recordar que ese grupo

metilo proviene del 5-Metil-THF, y será transferirlo a la Homocisteína, para sintetizar Metionina.

Salida de Vit-B₁₂ de la célula

La Vit-B₁₂ remanente dentro de la célula, en vez de ser utilizada como una coenzima, o ser destinada al almacenamiento, puede, alternativamente, salir de la célula para volver al torrente sanguíneo (u otro fluido extracelular). Este papel es particularmente importante en el intestino, donde las células epiteliales entregan Vit-B₁₂ al plasma, y este escape del metabolismo celular intraenterocítico constituye la fuente de ingreso de Vit-B₁₂ al organismo, y por ende a todos los tejidos. La proteína de resistencia a múltiples fármacos conocida como MRP-1 ha sido identificada como la encargada de exportar Vit-B₁₂ en estas células, desde el citosol hacia el torrente circulatorio⁽¹⁷⁾. Esta proteína pertenece a la familia de transportadores ABC por lo que es conocida como ABCC1, tiene un PM de ~190 kDa y genera el eflujo de sus substratos por hidrólisis de ATP. MRP1 es una proteína multifuncional y se caracterizó originalmente como un transportador capaz de exportación de diversas drogas antineoplásicas, pero hoy se sabe que transporta una larga lista de fármacos contribuyendo así al fenómeno de la farmacoresistencia. Se encuentra altamente expresada en los órganos excretores como intestino, hígado, riñón, BHE, etc. Si bien anteriormente se consideraba que la Vit-B₁₂ dejaba las células unida como complejo a la trans-cobalamina, hoy se pudo establecer, que lo hace en forma de sustancia libre, y su salida es mediada por el transporte activo ejercido por MRP-1⁽¹⁷⁾. Este mecanismo, concuerda con la observación de que el transporte y eliminación en orina de la vitamina en su forma "libre" es el fundamento del test de Schilling. En esta prueba, una vez saturados todos los sitios de unión proteica de la Vit-B₁₂ (fría) administrada por vía i.m., la Vit-B₁₂ radioactiva administrada por vía oral, seguirá su camino y se excretará en la orina en forma proporcional a la dosis absorbida. Llamativamente en modelos de ratones knock-out de MRP-1, no se observan anomalías morfológicas ni metabólicas significativas en estos ratones, dando la idea de que la excreción mediada por MRP-1 no sería crítica en el control de la utilización enzimática de la vitamina. A su vez, esta condición sugiere la posible presencia de otras vías alternativas de exportación de Vit-B₁₂ desde el interior de las células, e independiente de MRP-1.

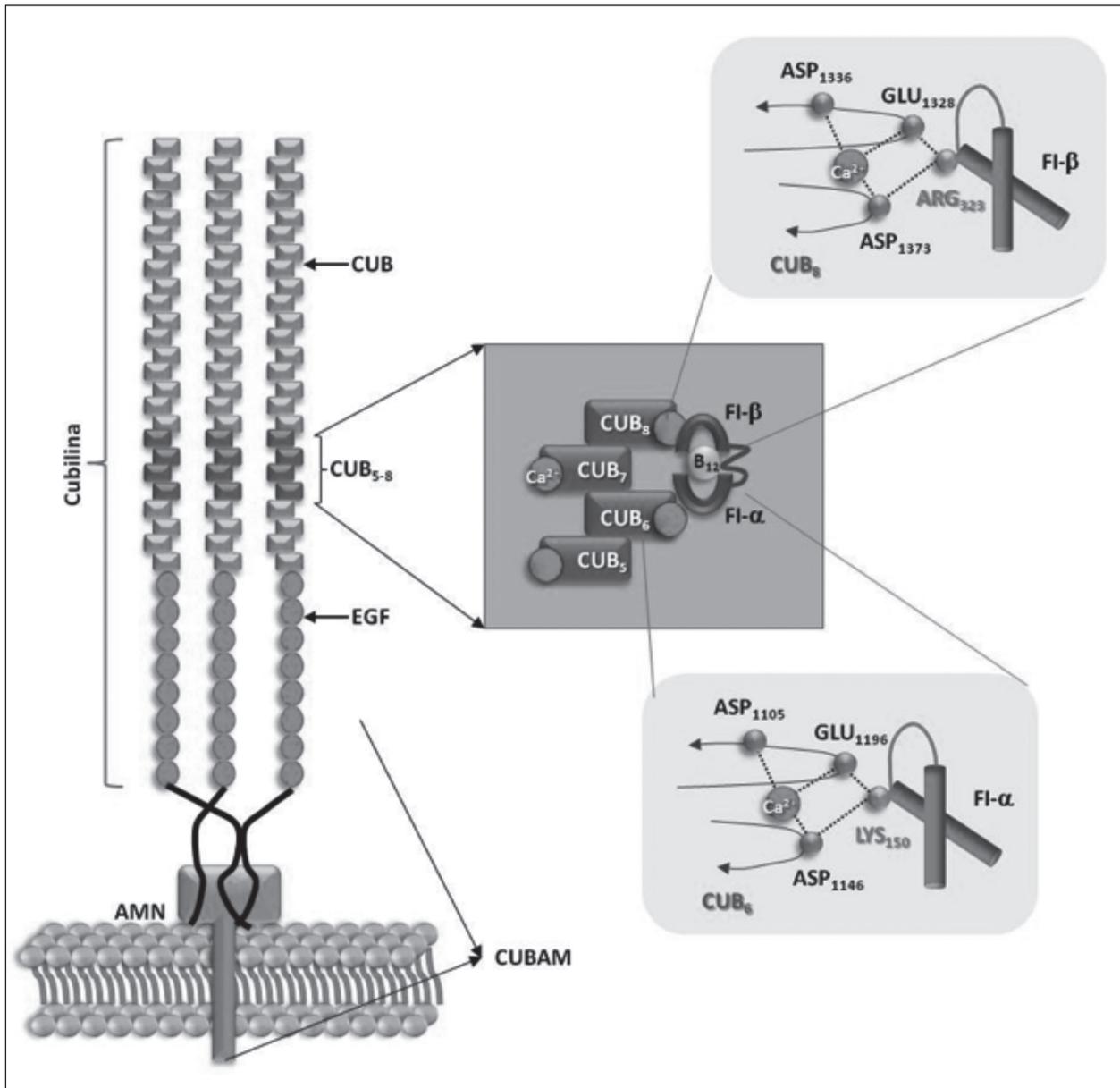


Figura 3: Representación esquemática del complejo receptor **CUBAM-AMN** y su unión al complejo **FI-Vit. B₁₂**. El componente transmembrana e integral **AMN** ancla el complejo receptor **CUBAM** a la membrana. La cubilina (460 kDa) está organizada en tres regiones: una parte amino-terminal que trimeriza la proteína, ocho dominios EGF y 27 dominios CUB, cada una con una estructura de β-barril- similares a los receptores de las inmunoglobulinas. Los dominios CUB 5-8 son los responsables del reconocimiento y unión al complejo factor intrínseco-Vit. B₁₂ ligados a las subunidades α y β del FI respectivamente. En ambos sitios de interacción, el Ca²⁺ es indirectamente involucrado en la unión mediante la colocación de dos residuos de carga negativa de la cubilina para la interacción directa con un residuo cargado positivamente del ligando del factor intrínseco.

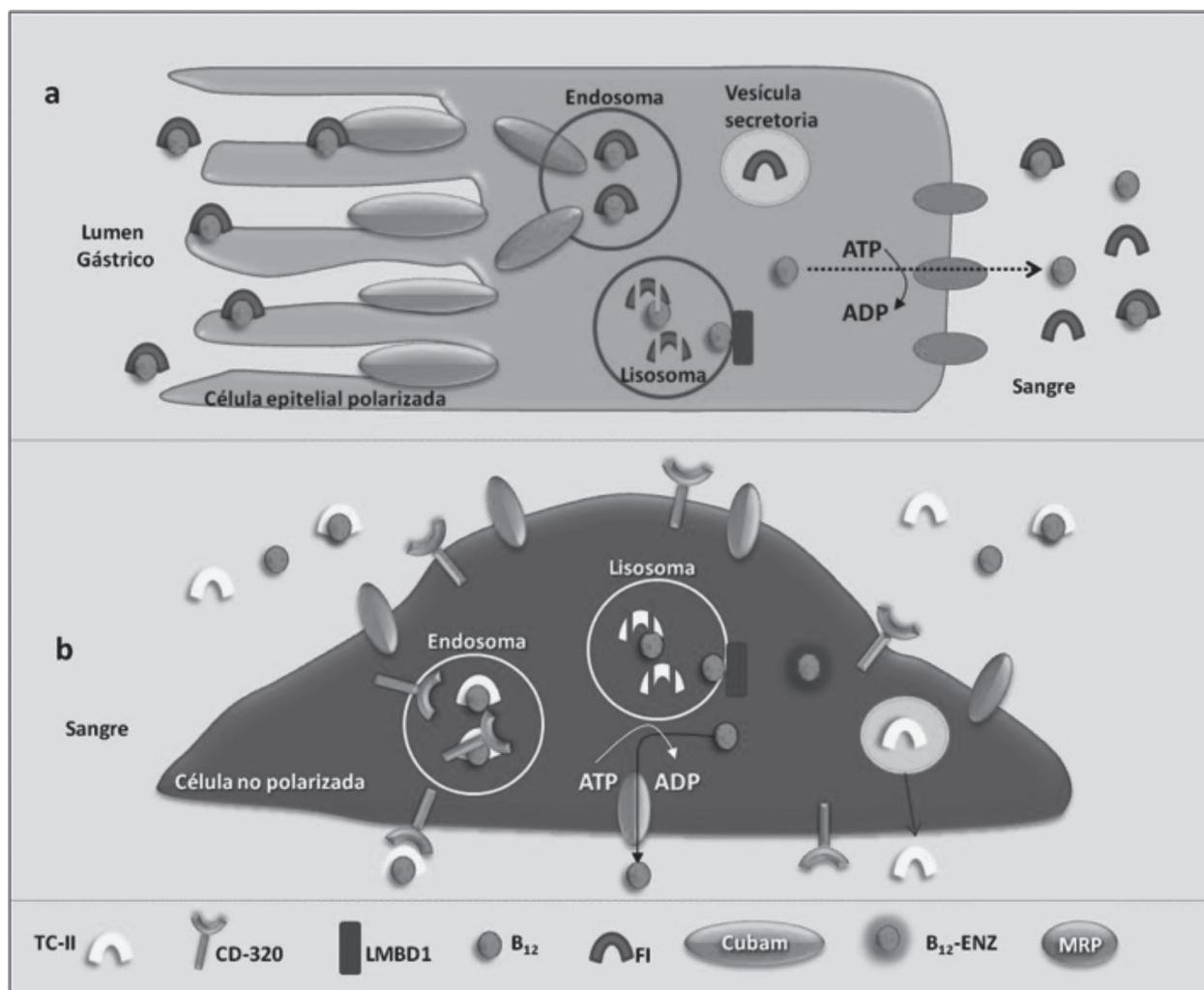


Figura 4: Esquema de las vías para la captación intracelular y salida de la Vit-B₁₂. **a:** Vías para el transporte celular de Vit-B₁₂ en una célula polarizada, como el caso del enterocito. El complejo Factor intrínseco-B₁₂ en el intestino es reconocido por el receptor **cubam** presente en el borde en cepillo apical de las células epiteliales del íleon terminal. Una vez interiorizado, el complejo factor intrínseco-B₁₂ se libera del transportador **cubam** en los endosomas y el complejo se transfiere a los lisosomas. **Cubam**, por otra parte, recicla hacia la superficie celular. En los lisosomas, las proteasas son responsables de la degradación del componente de proteína del complejo FI-Vit-B₁₂ y la salida posterior de B₁₂ del lisosoma requiere del transportador **LMBD1**.

Captación de Vit-B₁₂ desde el plasma hacia el interior celular.

Una vez producido el transporte desde el enterocito hacia el plasma, la Vit-B₁₂ circulará en el torrente sanguíneo unida a la Transcobalamina II (Tc-II). El receptor del complejo TcII-Vit-B₁₂ (CD320) se encuentra presente en las membranas de la mayoría de las células que requieren Vit-B₁₂, principalmente los hepatocitos. La región extracelular del CD320 contiene dos dominios de receptor de LDL tipo A,

altamente glicosilados. La internalización del complejo TcII-B₁₂-CD320 genera la degradación del receptor CD320 a nivel de los lisosomas, permitiendo la liberación de la Vit-B₁₂ de ese anclaje proteico para su posterior utilización. El papel de CD320 en la absorción de Vit-B₁₂ ha sido confirmada por el descubrimiento en un recién nacido con un aumento moderado de los niveles de ácido metilmalónico en

la orina, de una delección en el gen CD320, afectando estructuralmente al primer dominio del receptor de LDL del CD320, lo que causa una marcada disminución en la absorción por las células debido a pérdida del reconocimiento y unión del complejo TC-II-Vit-B₁₂. Curiosamente, la expresión CD320 parece estar estrictamente regulada de acuerdo con el estado de proliferación y diferenciación de la célula. El aumento de expresión de CD320 durante la proliferación celular es consistente con la alta demanda de Vit-B₁₂ (que tiene un papel importante en la síntesis de ADN y proteínas). Es interesante des-

taçar que al igual que lo que sucede con el Receptor Soluble de Transferrina, el CD320 cuenta con una forma soluble circulante en plasma.

También es tentador especular que el nivel celular de Vit-B₁₂ regula directa o indirectamente la expresión de CD320. Si los niveles altos de Vit-B₁₂ regulan la baja captación mediada por este receptor de TC-II-Vit-B₁₂ en los tejidos, una gran fracción del complejo se filtrará en el riñón, donde es absorbido por el otro receptor del complejo TC-II-Vit-B₁₂ conocida como megalina. (Figura 5)

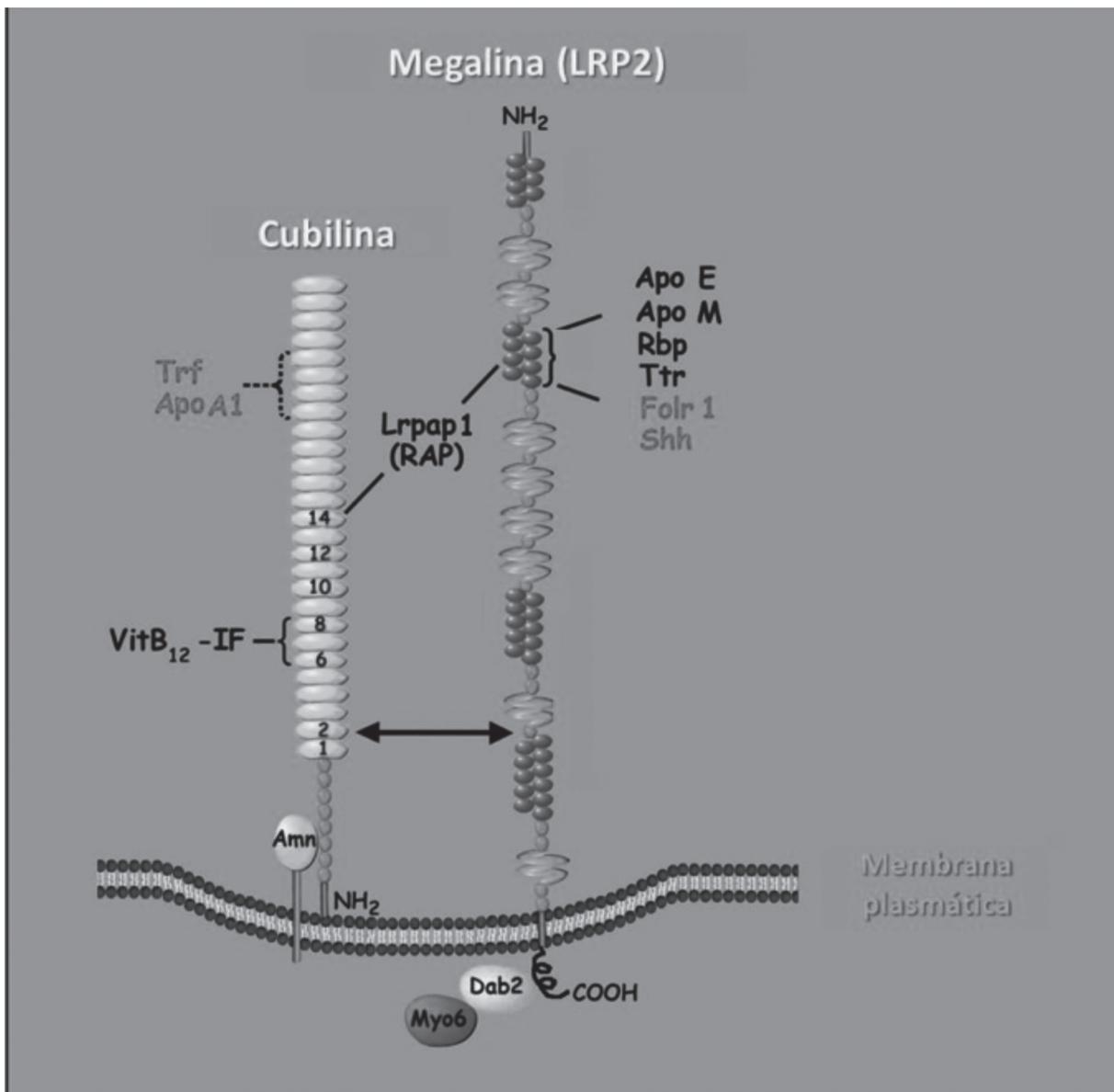


Figura 5: Megalina y Cubilina: La Megalina forma parte de un sistema de unión y reconocimiento a MÚLTIPLES FACTORES extracelulares. Llamativamente, varios de ellos son simultáneamente necesarios para la proliferación celular.

La megalina es un “receptor-transportador” de la superficie celular que consiste en una gran región extracelular, un solo dominio transmembrana, y una fracción menor citoplasmática donde está el C-terminal. El dominio extracelular de la megalina contiene cuatro grupos de “repeticiones” con función de “receptor” de diferentes estructuras tales como la unión a lipoproteínas, factores de crecimiento, etc. El segundo de estos grupos de repeticiones se ha identificado como un sitio de unión común para varios ligandos incluyendo la apolipoproteína E (Apo E), apolipoproteína M (Apo M), proteína de unión a retinol (RBP) y transtirretina (TTR). La megalina también se une a la forma soluble del receptor de folato (Folr1), y al factor morfógeno (Shh), de gran importancia en la auto-renovación de los stem cells. La pequeña fracción citoplasmática de la megalina se une a una estructura Dab2, la cual es una proteína adaptadora citosólica muy importante que favorece la endocitosis de los complejos unidos a megalina, y recluta a otra estructura conocida como Myo6, asociada a las vesículas revestidas de clatrina. Estas estructuras son fundamentales en la mecánica de la endocitosis para la mayoría de los receptores de membrana que se internalizan al unirse a sus ligandos. En el sector extracelular, la proteína LRPAP1/RAP puede unirse a megalina y a cubilina. Los ligandos de cubilina incluyen a la transferrina (TRF), albúmina, hemoglobina, apolipoproteína A1 (ApoA1) y el complejo FI-Vit-B₁₂.

Reabsorción renal de la Vit-B₁₂

La reabsorción de Vit-B₁₂ en el riñón se explica por la filtración renal y la recaptura del complejo Transcobalamina-II-Vit-B₁₂ por el Receptor-Transportador megalina (**Figuras 2 y 5**), una proteína de la familia del receptor de LDL-600 kDa que se encuentra en la membrana apical de las células del túbulo proximal. La megalina tiene una alta afinidad para la TC-II (transcobalamina-2) y evita la pérdida urinaria de la Vit-B₁₂ presente en el filtrado glomerular renal, mediante la internalización del complejo TC-II-Vit-B₁₂. Una vez dentro de la célula renal, la Vit-B₁₂ puede unirse a enzimas específicas dependientes de la vitamina para su actividad, puede ser almacenada, o bien es liberada de la célula⁽¹⁸⁾.

Sobre la base de los resultados de estudios en animales, la Vit-B₁₂ parece acumularse en los lisosomas de los riñones, lo que indica una función de almace-

namiento para esta organela. Queda por establecer cuál sería el sistema exportador de la Vit-B₁₂ a nivel de la membrana basolateral del túbulo renal, dado que MRP-1 no se expresa normalmente en dicho túbulo⁽¹⁹⁾.

Curiosamente, la megalina se coexpresa junto con **CUBAM** en el riñón y en varios otros epitelios de absorción, incluyendo el intestino. Tanto megalina y **CUBAM** se clasifican como receptores multi-ligando y, antes del descubrimiento de la función de correceptor AMN, se pensaba que megalina era esencial para la actividad endocítica de la cubilina. De hecho, los estudios indican que la megalina tiene una función importante tanto en el sistema endocítico como en la regulación de la expresión y/o función del **CUBAM** en la cubilina⁽²⁰⁾. Sin embargo, la expresión aislada de estas proteínas ha demostrado ahora que el complejo **CUBAM** puede funcionar independientemente de la expresión de megalina y viceversa⁽²¹⁾.

Síntomas clínicos de la deficiencia de Vit-B₁₂*

- Anemia Megaloblastica
 - Fatiga
 - Cansancio
 - Mareos
- Enfermedad desmielinizante nervioso central
 - Hormigueo o entumecimiento en los dedos de manos y pies
 - Problemas de marcha y equilibrio
 - Irritabilidad, depresión, falta de memoria y problemas de atención y concentración
 - Trastornos psiquiátricos: demencia, manía, psicosis y cambios de personalidad
 - Atrofia óptica
- Disfunción gastrointestinal
 - Glositis
 - Malabsorción
- Infertilidad
- Vitiligo

* La lista no es exhaustiva, y ninguno de los síntomas son un requisito previo para el diagnóstico de deficiencia de vitamina B12.

Conclusiones

La investigación intensiva en esta área ha identificado un número considerable de genes y proteínas implicadas en el transporte de la Vit-B₁₂. Sobre la base de estos hallazgos, ahora es posible delinear la

vía de transferencia de la Vit-B₁₂ desde los alimentos hasta las células del cuerpo. Este conocimiento explica y ayuda en el diagnóstico de formas heredadas hasta ahora desconocidas de enfermedades relacionadas a la deficiencia de Vit-B₁₂, que puede ser el resultado de defectos en los genes implicados en cualquiera de las etapas de ese largo y complejo recorrido.

El tránsito de la Vit-B₁₂ por el cuerpo también ha planteado nuevas preguntas. Por ejemplo, las funciones exactas de muchos de los productos génicos intracelulares importantes para el transporte y/o el metabolismo de la Vit-B₁₂ son aún desconocidos.

La existencia de un 15-20% de casos de mala absorción de Vit-B₁₂ de tipo hereditaria recesiva resulta aún inexplicable, lo cual sugiere que varias proteínas reguladoras del transporte y metabolismo de la Vit-B₁₂ no han sido identificadas⁽²²⁾.

Por otra parte, en contraste con la información detallada sobre el transporte extracelular y transmembrana de la Vit-B₁₂ en el sistema gastrointestinal, revisado brevemente aquí, todavía queda mucho por aprender sobre el transporte de la Vit-B₁₂ en otros órganos. En particular, los mecanismos de transporte de la Vit-B₁₂ en el sistema nervioso central (SNC) son en gran parte desconocidos; a la luz de los síntomas neurológicos causados por la deficiencia de la vitamina, parece muy importante estudiar el transporte de la Vit-B₁₂ en el SNC. Los mecanismos descritos en relación a la trampa del Metil-folato y su relación a la recuperación de Metionina, descritos por Scott y Weir en la década del 80 (Revisado en el Libro Educacional SAH, 2011, pg 69-81), explican parcialmente estos síntomas neurológicos, pero los mecanismos de transporte y sus regulaciones, son un universo fascinante que abre nuevas posibilidades diagnóstico-terapéuticas.

Aunque totalmente especulativa en la actualidad, muchas de las proteínas mencionadas en esta revisión también podrían transportar la Vit-B₁₂ a través de la barrera hematoencefálica y en el propio parénquima del SNC. Del mismo modo será importante para delimitar cómo se produce el transporte materno-fetal de Vit-B₁₂ en la placenta, así como el transporte (secreción) desde la glándula mamaria hacia la leche materna, ya que estos dos sistemas son esenciales en las primeras etapas de la vida. La búsqueda continua de proteínas que transportan Vit-B₁₂ podría, sin embargo, complicarse por la redundancia

en las vías de transporte, como parece ser el caso del flujo o salida de la Vit-B₁₂ de las células.

En un entorno clínico, el descubrimiento de nuevos transportadores de Vit-B₁₂ podría traducirse directamente en nuevas opciones para las pruebas genéticas y la detección de las causas hereditarias de deficiencia funcional de la vitamina. Por otra parte, el diagnóstico de deficiencia de Vit-B₁₂ puede ser guiado por la medición de la fracción activa en plasma de la transcobalamina-II conocida como holo-transcobalamina (Transcobalamina-Vit-B₁₂). Este nuevo marcador parece reforzar aún más el diagnóstico de deficiencia funcional de la vitamina B₁₂, que en casos límite puede ser difícil de diagnosticar basándose solamente en los síntomas y los resultados de las pruebas de laboratorio que se utilizan actualmente en forma rutinaria.

En términos de la terapia, el desarrollo del complejo factor intrínseco-B₁₂ (recombinante) para la administración oral ha sido propuesto como un sustituto para inyecciones intramusculares de vitamina B₁₂ (con un intervalo de 1-3 meses) o megadosis de Vit-B₁₂ por vía oral⁽²³⁾. Sin embargo, respecto a esta última estrategia, un estudio realizado en nuestra cátedra con megadosis orales de Vit-B₁₂ administradas a individuos normales sanos, mostraron un valor pico máximo no mayor a 900 pg/dl a las 3 horas post dosis, valor que no supera el máximo del rango normal de la vitamina circulante descrita para el método empleado.

Este estudio sugiere que no se puede absorber más Vit-B₁₂ que la cantidad disponible a ser transportada por los sistemas descritos, y que del mismo modo, megadosis intramusculares resultaron en valores circulantes excesivamente elevados, que persistieron durante las 24hs de seguimiento, indicando que la capacidad de eliminación (o biodistribución tisular), también está limitada por los transportadores saturados⁽²⁴⁾.

Así, la administración del complejo FI-Vit-B₁₂, imita la absorción fisiológica normal de la vitamina y evita tanto la incomodidad de las inyecciones como también el potencial, hasta ahora desconocido, riesgo asociado a una ingesta diaria de >200 veces la dosis fisiológica de la vitamina.

Las drogas dirigidas contra las vías de transporte de la Vit-B₁₂ han sido investigadas por varios grupos como un enfoque alternativo en el tratamiento del cáncer. Aunque una terapia de ese tipo aún no

La cantidad de mutaciones descritas en los diferentes genes implicados en los 8 procesos metabólicos de la Vit-B₁₂ son sumamente numerosas, y hoy día pueden ser detectadas por métodos de secuenciación de alto rendimiento (NGS). La disponibilidad de estas tecnologías, y la generación de paneles de mutaciones específicas como perfiles genéticos asociados a diferentes cuadros clínicos, es una herramienta que permitirá ir descifrando las incógnitas que aún quedan sin respuestas.

Declaración de conflictos de interés:

El autor declara no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

- 1-McLean E., de Benoist, B. & Allen, L. H. Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. *Food Nutr. Bull.* 29 (2 Suppl.), S38–S51 (2008).
- 2- Dali-Youcef N. & Andres E. An update on cobalamin deficiency in adults. *QJM* 102, 17–28 (2009).
- 3-Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol.* 5, 949–960 (2006).
- 4-Martens JH., Barg H, Warren MJ. & Jahn D. Microbial production of vitamin B12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 275–285 (2002).
- 5-Kozyraki, R. et al. The human intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin: molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive megaloblastic anemia (MGA1) region. *Blood* 91, 3593–3600 (1998).
- 6- Tanner SM. et al. Hereditary juvenile cobalamin deficiency caused by mutations in the intrinsic factor gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 4130–4133 (2005).
- 7- Castle, W. B. The etiology of pernicious and related macrocytic anemias. *Science* 82,159–164 (1935).
- 8- Li N., Rosenblatt DS, Kamen BA, Seetharam S & Seetharam B. Identification of two mutant alleles of transcobalamin II in an affected family. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1835–1840 (1994).
- 9- Qian L, Quadros EV, Regec A, Zittoun J. & Rothenberg SP. Congenital transcobalamin II deficiency due to errors in RNA editing. *Blood Cells Mol. Dis.* 28, 134–142 (2002).
- 10- Nexo E. & Hoffmann-Lucke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am. J. Clin. Nutr.* 94, 359S–365S (2011).
- 11- Allen RH, Seetharam B, Podell E & Alpers DH. Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *J. Clin. Invest.* 61, 47–54 (1978).
- 12- Fyfe JC. et al. The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood* 103, 1573–1579 (2004).
- 13-Grasbeck R, Gordin R, Kantero I. & Kuhlback B. Selective vitamin B12 malabsorption and proteinuria in young people. A syndrome. *Acta Med. Scand.* 167, 289–296 (1960).
- 14- Aminoff M. et al. Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nat. Genet.* 21, 309–313 (1999).
- 15- Tanner S. M. et al. Amnionless, essential for mouse gastrulation, is mutated in recessive hereditary megaloblastic anemia. *Nat. Genet.* 33, 426–429 (2003).
- 16- Kristiansen M. et al. Cubilin P1297L mutation associated with hereditary megaloblastic anemia 1 causes impaired recognition of intrinsic factor-vitamin B(12) by cubilin. *Blood* 96, 405–409 (2000).

- 17- Beedholm-Ebsen, R. et al. Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood* 115, 1632–1639 (2010).
- 18- Birn, H. The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291, F22–F36 (2006).
- 19- Peng, K. C. et al. Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 757–768 (1999).
- 20- Nagai, J. et al. Mutually dependent localization of megalin and Dab2 in the renal proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289, F569–F576 (2005).
- 21- Pedersen, G. A., Chakraborty, S., Steinhäuser, A. L., Traub, L. M. & Madsen, M. AMN directs endocytosis of the intrinsic factor-vitamin B(12) receptor cubam by engaging ARH or Dab2. *Traffic* 11, 706–720 (2010).
- 22- Shah, N. P., Beech, C. M., Sturm, A. C. & Tanner, S. M. Investigation of the ABC transporter MRP1 in selected patients with presumed defects in vitamin B12 absorption. *Blood* 117, 4397–4398 (2011).
- 23- Kuzminski, A. M., Del Giacco, E. J., Allen, R. H., Stabler, S. P. & Lindenbaum, J. Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamin. *Blood* 92, 1191–1198 (1998).
- 24- Lazarowski A, Rochna Viola EM. Es posible la sobrecarga tisular de Vitamina B12 en sujetos normales? *Revista ABA* 1983;47,1-2:1-6.
- 25- Clardy, S. M., Allis, D. G., Fairchild, T. J. & Doyle, R. P. Vitamin B12 in drug delivery: breaking through the barriers to a B12 bioconjugate pharmaceutical. *Expert Opin. Drug Deliv.* 8, 127–140 (2011).
- 26- Quadros, E. V., Nakayama, Y. & Sequeira, J. M. Targeted delivery of saporin toxin by monoclonal antibody to the transcobalamin receptor, TCbIR/CD320. *Mol. Cancer Ther.* 9, 3033–3040 (2010).
- 27- Sean Froese D and Gravel RA. Genetic disorders of vitamin B12 metabolism: eight complementation groups—eight genes. *Expert Rev Mol Med.* 2010;12:e37.