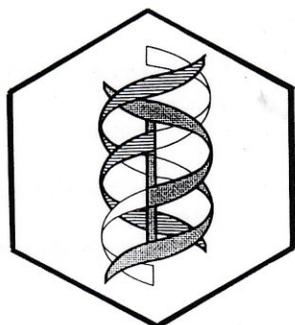


BEB 99

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la
**ASOCIACIÓN MEXICANA DE
PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C**

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIÓDICA** (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias).

COMITÉ EDITORIAL

EDITORES FUNDADORES

ENRIQUE PIÑA GARZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

EDITORES

SOCORRO CONCEPCIÓN DURÁN VARGAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

FEDERICO MARTÍNEZ MONTES

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

RAFAEL MORENO SÁNCHEZ

Instituto Nacional de Cardiología "Dr Ignacio Chávez"

JORGE JOEL REYES MÉNDEZ

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES ASOCIADOS

EDMUNDO CHÁVEZ COSÍO

Instituto Nacional de Cardiología "Dr Ignacio Chávez"

MARÍA TERESA ELIZABETH FLORES RODRÍGUEZ

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

MARINA GAVILANES RUIZ

Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

ELIZABETH LANGLEY McCARRON

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

JAIME MAS OLIVA

Instituto de Fisiología celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ASISTENTE EDITORIAL

ELISA SALLES MORA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

MARÍA DE LOS ANGELES BOFFIL CÁRDENAS

Facultad de Ciencias Médicas
Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba

ALMA LETICIA BORBOA OSUNA

Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Sinaloa

ARMANDO FRANCISCO VARGAS ALBORES

Biotecnología Marina
Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo de Sonora

KARLA CARVAJAL AGUILERA

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

RAUL MIGUEL COVIAN

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

SILVIA DEVARIS RAMOS

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVANInstituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México**DANIEL ALEJÁNDRIO FERNANDEZ**Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México**CARLOS GÓMEZ LOJERO**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional**LUIS GONZÁLEZ DE LA VARA**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional**DIEGO GONZÁLEZ HALPEN**Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México**RICARDO JASSO CHÁVEZ**

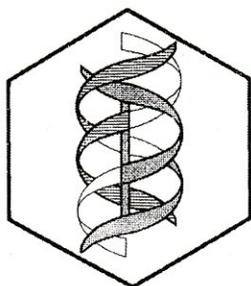
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZInstituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México**IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR**Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México**HERMINIA LOZA TAVERA**Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México**BLAS LOTINA HENNSSEN**Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México**JOSE LUIS MOLINARI SORIANO**Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México**HORACIO REYES VIVAS**Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México**SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ**

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

LUIS HUMBERTO SILVERIO TORRE

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

MARÍA EUGENIA TORRES MARQUEZFacultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México**SALVADOR URIBE CARVAJAL**Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de MéxicoAsociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, ACDepartamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina,
UNAMFacultad de Medicina,
UNAM

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (BEB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, CP 04510 México, D F. Certificados de: Licitud de Título No 6703; Licitud de Contenido No 6989; No de expediente 1/432"92"/8443; Reserva al título en derecho de autor No 6703. Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIÓDICA** (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias). Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Correggio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,300 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg No PP-DF-026 1098; UNAM-Depto de Bioquímica y Facultad de Medicina.

EDITORIAL

LA REVISIÓN DE MANUSCRITOS POR INVESTIGADORES CON GRAN EXPERIENCIA EN EL TEMA LA REVISIÓN: LA BASE DE UN BUEN TRABAJO EDITORIAL Y LA BÚSQUEDA DE UNA REVISTA CADA VEZ MÁS SÓLIDA

La publicación de una revista como el Boletín de Educación Bioquímica es el resultado de la colaboración de quienes envían sus manuscritos, quienes los revisan y por supuesto de quienes la leen y la emplean en la docencia o en la difusión del conocimiento y la ciencia. El cuidado con el que se revisan los manuscritos enviados para su publicación representa un punto crítico para definir la calidad de los trabajos publicados. Este trabajo, no sólo determina que los manuscritos se ajusten a los lineamientos editoriales y de formato del BEB. También define, y de manera tal vez más importante, sus contenidos y la manera en que éstos se presentan; para que sean adecuados y no presenten errores u omisiones conceptuales.

Hasta el año pasado, el trabajo de revisión, se había realizado casi exclusivamente por los miembros del Comité Editorial del BEB. Sin embargo, el creciente número de manuscritos de áreas afines a la bioquímica: inmunología, parasitología, genética y biología celular, sólo por nombrar algunos ejemplos y la gran especialización en los conceptos y el lenguaje nos ha exigido acercar al comité editorial a investigadores expertos y reconocidos en su campo a la lista de personas que revisan los manuscritos. Aún a pesar de la renovación de nuestro Comité Editorial (Editorial del BEB Vol. 18 No. 1), nuestro campo de especialidad no

alcanza a cubrir, de la manera requerida, todas las áreas en las que se reciben trabajos. Por esta razón, hemos creado la categoría de "Revisores Asociados al Comité Editorial" dentro de la estructura editorial del BEB.

Para darse una idea del trabajo que la revisión implica, baste recordar que cada trabajo es revisado por un mínimo de tres personas, uno o dos miembros del Comité Editorial y uno o dos de los Revisores Asociados al Comité Editorial, quienes determinan si el material y su contenido son adecuados o no para el BEB, la pertinencia del tema, la forma como es tratado el contenido, la correcta actualización de los conceptos y el manejo global de los conocimientos; en esta revisión se hace un importante trabajo, para permitir al autor tener las bases para realizar las correcciones que se consideran necesarias y/o las aclaraciones que se requieren en un trabajo con objetivos de difusión y enseñanza. En promedio los manuscritos que contienen material adecuado para el BEB, regresan al menos una vez a los autores, por lo que las personas que los revisaron por primera vez, deben revisar la segunda versión y evaluar si el trabajo está a punto para su publicación.

Los autores de un número importante de los trabajos que se reciben y se publican en el BEB son alumnos de Licenciatura y de Posgrado. Por

lo cual, la seriedad, el cuidado y en general el profesionalismo con el que se realizan estas revisiones, no sólo garantizan la confiabilidad en la información que se obtenga de la revista, sino que a su vez es un ejercicio formativo, para este grupo de autores que se encuentran adquiriendo experiencia en el envío de sus trabajos.

Por lo anterior, queremos agradecer el trabajo realizado por nuestros colegas cuya colaboración en esta labor ha contribuido a mejorar la calidad

de los trabajos publicados en el BEB y por ende la de nuestra revista. Por esta razón, y como un reconocimiento a su trabajo, a partir de este volumen, publicaremos la lista de quienes están colaborado con el BEB en esta categoría de Revisores Asociados al Comité Editorial.

Alejandro Zentella Dehesa
José Víctor Calderón Salinas
Comité Editorial del
Boletín de Educación Bioquímica

MOTILIDAD, BIOGENESIS FLAGELAR Y QUIMIOTAXIS BACTERIANA

Bertha González-Pedrajo y Georges Dreyfus. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-600, 04510, México, D. F., México. Fax 5616-2282; Correo electrónico: bpedrajo@ifisiol.unam.mx, ó gdreyfus@ifisiol.unam.mx

RESUMEN

El flagelo es el orgánulo encargado de la motilidad bacteriana en el que un largo filamento helicoidal o propela, es impulsado por un motor rotatorio embebido en la superficie celular. La estructura básica del flagelo es: filamento, gancho y cuerpo basal, la cual varía muy poco en el reino procarioto. Estos orgánulos, aislados de especies tan diversas como arqueobacterias, espiroquetas y especies Gram (-) y Gram (+), conservan todos la misma estructura general. Se requiere de aproximadamente 50 genes para la construcción de un flagelo totalmente funcional y su expresión está estrictamente controlada en un orden jerárquico. La morfogénesis del flagelo se encuentra acoplada con la regulación de la transcripción en el regulón flagelar.

Las bacterias al nadar cambian aleatoriamente de dirección en pocos segundos; sin embargo, si se encuentran frente a un gradiente de concentración, la frecuencia de cambio de dirección puede ser alterada para que la trayectoria se dé en un sentido favorable a la vida de la bacteria. La modulación de la dirección de la rotación flagelar constituye la base de la quimiotaxis.

PALABRAS CLAVE: flagelo procarioto, morfogénesis flagelar, sistemas de exportación, regulón, quimiotaxis.

ABSTRACT

The bacterial flagellum is a motility apparatus in which a long helical filament, the propeller, is driven by a rotary motor embedded in the cell surface. The basic flagellar structure: filament, hook and basal body, varies very little throughout the prokaryotic kingdom. Isolated organelles from species as diverse as archaebacteria, spirochaetes, and Gram (-) or Gram (+) species all have the same general structure. Approximately 50 genes

are required for the construction of a fully functional flagellum and their expression is strictly controlled in a hierarchical order. Morphogenesis of the flagellum is coupled to transcriptional regulation of the flagellar regulon.

Free swimming bacteria randomly change direction every few seconds, but if a gradient is encountered the direction-changing frequency can be biased to move the bacterium in a favorable direction. Modulation of the direction of flagellar rotation is the basis of chemotaxis.

KEY WORDS: prokaryotic flagellum, flagellar morphogenesis, export systems, regulon, chemotaxis.

MOTILIDAD BACTERIANA

El Flagelo Procarioto

En la búsqueda de nutrientes para su supervivencia, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos adaptativos entre los que se encuentra la motilidad.

Muchas especies bacterianas tienen la capacidad de moverse en respuesta a diversos estímulos ambientales y dicho movimiento puede ocurrir a partir de dos mecanismos: el nado o el deslizamiento; este último involucra el movimiento lento (1-60 $\mu\text{m}/\text{min}$) sobre superficies sólidas y es característico de Myxobacterias (1); sin embargo, el aparato responsable de este tipo de motilidad hasta ahora no ha sido bien caracterizado. Por otro lado, la motilidad bacteriana que se genera a través del nado, se debe a la rotación de orgánulos especializados denominados flagelos.

La capacidad de las bacterias de moverse en forma dirigida, ya sea por señales físicas o químicas, le confiere al microorganismo beneficios potenciales entre los que se encuentran una mayor eficien-

cia en la adquisición de nutrientes, el evitar sustancias tóxicas, el establecer relaciones simbióticas, así como el poder alcanzar los sitios óptimos de colonización en el caso de bacterias patógenas. Debido a esto, las bacterias móviles pueden ser aisladas de habitats tan diversos como las ventosas hipertérmicas del océano, las aguas superficiales, del suelo, de los contenidos del rumen, de la mucosa gástrica, o bien, de la placa dental (2).

Los sistemas flagelares más estudiados son los de las bacterias entéricas Gram (-) *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, que presentan entre 5 y 10 flagelos por célula distribuidos alrededor del cuerpo celular, lo que se conoce como un patrón flagelar peritrico (3). Sin embargo, existen varios patrones flagelares y tanto el número como la localización de los flagelos, varía entre las diferentes especies (Fig 1). En el caso de las espiroquetas, el flagelo se encuentra localizado entre las membranas citoplásmica y externa.

Existen grandes diferencias entre el flagelo de organismos procariotos y eucariotos. El filamento bacteriano (20 nm de diámetro) se encuentra constituido por miles de subunidades de un solo tipo de proteína, mientras que el flagelo eucarioto

(200 nm de diámetro) presenta una compleja arquitectura de 9 + 2 microtúbulos y está formado por más de 200 diferentes polipéptidos. Las principales diferencias entre éstos se refieren al mecanismo de movimiento y a la fuente de energía utilizada (4). A diferencia del flagelo eucarioto, que gracias al deslizamiento entre microtúbulos se mueve como látigo para impulsar al organismo, el flagelo bacteriano rota, por tanto no realiza un trabajo quimiomecánico *per se*, sino que es pasivamente dirigido por un motor de rotación bidireccional. La fuerza de rotación o torca, tanto en la dirección a favor como en contra de las manecillas del reloj, se genera en la base del flagelo y se transmite hacia las estructuras extracelulares.

Por otro lado, en organismos procariotos, la fuente de energía para la rotación flagelar no involucra la hidrólisis de ATP, como es el caso del flagelo eucarioto, sino un gradiente iónico transmembranal ya sea de protones, o de iones sodio en el caso de especies alcalófilas. Por lo tanto, el motor de rotación del flagelo bacteriano es un transductor energético que convierte la energía del gradiente electroquímico en trabajo mecánico (4).

Estructura Flagelar

El flagelo es una de las estructuras más complejas de la célula bacteriana, ya que constituye parte integral de sus diferentes compartimentos como son la membrana celular, el espacio periplásmico, la pared celular o capa de peptidoglicano y la membrana externa; presentando también componentes de localización tanto citosólica como extracelular (3).

Estructuralmente, el flagelo se encuentra constituido por un gran número de proteínas denominadas "Flg", "Flh", "Fli" y "Mot". La asignación de las letras depende de la localización cromosomal de los genes que las codifican. El flagelo se puede dividir en tres segmentos principales que se distinguen claramente al microscopio electrónico (Fig 2).

a) El Filamento. Esta es una estructura helicoidal de localización extracelular, que constituye el componente propulsor del flagelo y que genera el trabajo hidrodinámico en el medio. Esta propela es una estructura rígida, que varía entre 5 y 15 μm de longitud, con 0.02 μm de diámetro; es un

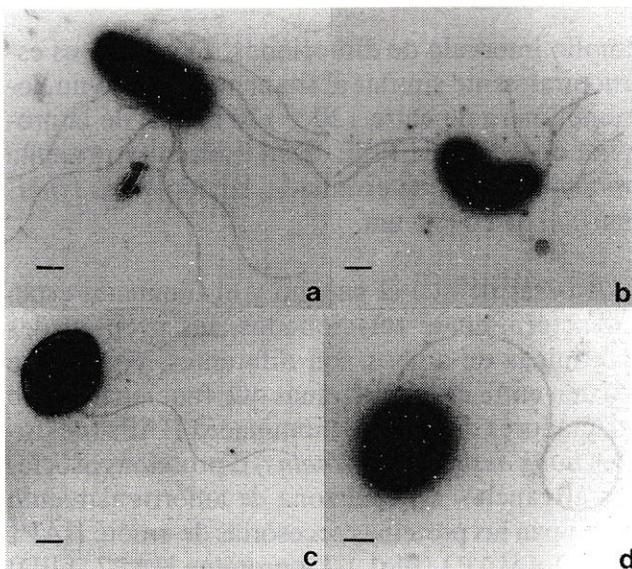


Figura 1. Micrografías electrónicas de bacterias con diferentes patrones flagelares. a) peritrico en *Salmonella typhimurium*; b) anfitríco en *Rhodospirillum rubrum*; c y d) monotríco en *Rhodobacter sphaeroides*, con un solo flagelo de localización subpolar. Las barras corresponden a 50 nm.

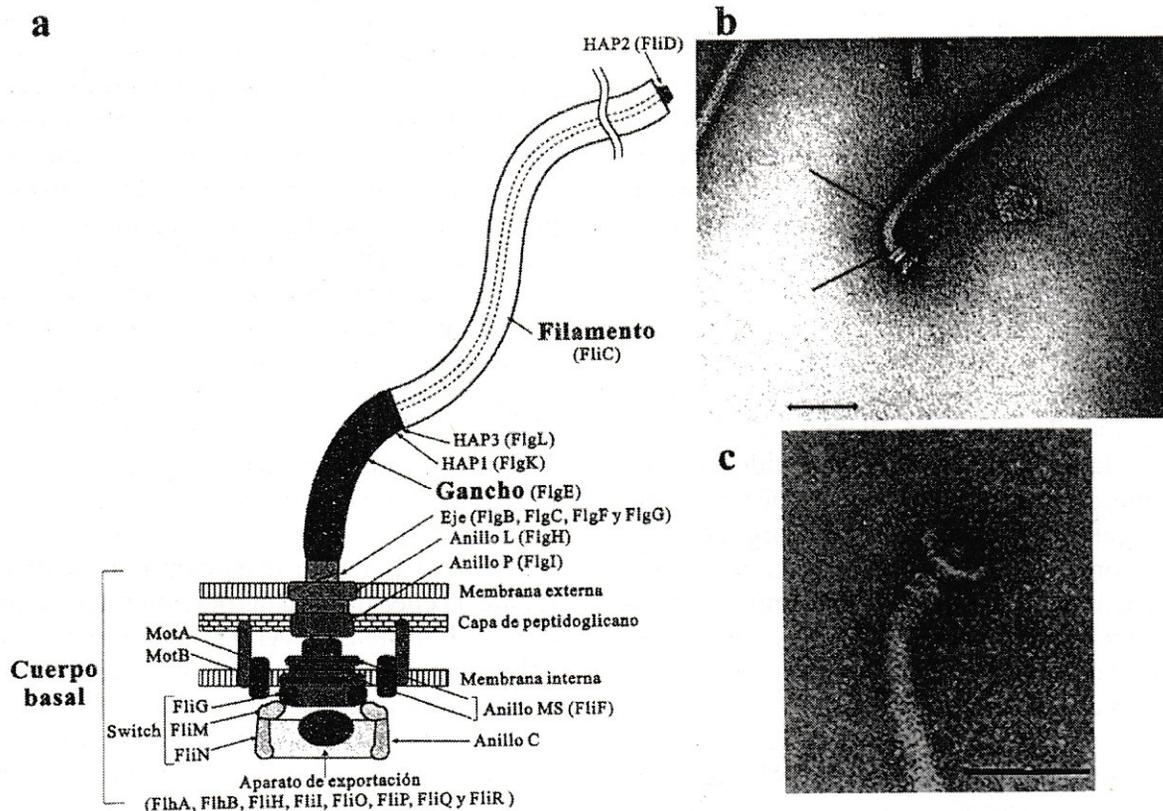


Figura 2. a) Esquema del flagelo bacteriano. b) Fotografía al microscopio electrónico del flagelo de *Salmonella typhimurium* que muestra el filamento, el gancho (delimitado por dos flechas) y el cuerpo basal (anillo MS, eje y anillos L y P). c) Fotografía al microscopio electrónico del flagelo de *S. typhimurium* en la que se muestra un cuerpo basal que incluye el anillo C. Las barras corresponden a 100 nm.

homopolímero constituido por miles de subunidades de la proteína denominada FliC o flagelina (3). La longitud de dicha hélice en *S. typhimurium*, por ejemplo, equivale a entre 5 y 7 veces el tamaño de la bacteria. El diseño estructural del filamento no implica la simple unión de moléculas iguales de forma regular, cuya consecuencia inevitable sería la generación de una estructura tubular. Por el contrario, las subunidades de flagelina se organizan de manera no equivalente formando una hélice izquierda, lo que permite que la fuerza rotacional o torca se convierta en una fuerza de traslación que genere un “empuje mecánico”. El filamento también es clínicamente importante debido a su potencia y variabilidad antigénica (3,5).

b) El Gancho. Esta es una estructura flexible de acoplamiento y de localización extracelular, que conecta el filamento con el motor celular. La flexibilidad de dicho conector universal permite que se transmita la fuerza de rotación al filamento en un

amplio intervalo de direcciones. El gancho es estructuralmente similar al filamento, siendo un homopolímero de entre 120 y 130 copias de la proteína denominada FlgE. Esta estructura presenta un tamaño bien determinado, siendo en *S. typhimurium* de 55 ± 6 nm.

A pesar de que el gancho y el filamento están estructuralmente relacionados, las propiedades mecánicas de ambos son diferentes, por lo que existen entre éstos, proteínas que funcionan como adaptadores de unión denominadas HAPs (del inglés *hook associated proteins*) o proteínas asociadas al gancho. En esta zona de amortiguamiento participan las proteínas accesorias de unión: HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL). La proteína HAP2 (FliD) se localiza en la parte distal del flagelo y funciona como una tapa del filamento denominada proteína de coronamiento, la cual se requiere para el correcto ensamblaje de los monómeros de flagelina (5).

c) El Cuerpo Basal. Este es un complejo multiproteico embebido en la superficie celular, en el que se localiza el motor flagelar. Esta estructura consiste de un eje central y 4 complejos en forma de anillos. El anillo MS, formado por subunidades de la proteína FliF, se encuentra localizado en la membrana citoplásmica y se ha propuesto que constituye parte del rotor del motor flagelar, donde se genera la torca. Los anillos externos P (proteína FlgI) y L (proteína FlgH), se encuentran localizados en el mismo plano de la capa de peptidoglicano y de la membrana externa de lipopolisacáridos respectivamente, formando un cilindro que genera un espacio que permite a la estructura del eje rotar libremente evitando fricción. Dicha función de rodamiento o forro, mantiene al eje en su lugar y le permite penetrar las múltiples capas de la pared celular, lo que se apoya en el hecho de que los organismos Gram (+) carecen de este par de anillos (3).

El eje está constituido por varias subunidades de 4 proteínas denominadas FlgB, FlgC y FlgF en el eje proximal y FlgG formando el eje distal. Esta estructura funciona como una flecha conductora que se une al rotor y que se encarga de transmitir la torca, generada por el motor, hacia las estructuras extracelulares: gancho y filamento. Por lo tanto, el anillo MS, el eje, el gancho y el filamento constituyen una sola unidad rotatoria, mientras el par de anillos L y P forman la parte estacionaria (3,5).

Por otro lado, existen dos proteínas necesarias para la rotación del motor, MotA y MotB. La supresión de cualquiera de los genes *mot* da lugar a un fenotipo paralizado, es decir, se sintetiza el flagelo silvestre pero no rota. Las proteínas Mot se localizan en la membrana celular rodeando al anillo MS. MotB presenta un cruce transmembranal y su dominio periplásmico se une a la capa de peptidoglicano; debido a esto, se le ha asignado una función de anclaje o elemento estator del motor flagelar. Por su parte, MotA presenta cuatro cruces transmembranales y junto con MotB, constituye el canal de protones que permite el acoplamiento entre el gradiente electroquímico y la rotación (5,6). En conclusión, el motor molecular del flagelo bacteriano, al igual que los motores constituidos de materiales metálicos, presentan un mo-

tivo estructural común basado en que la rotación ocurre entre un rotor y un estator.

Por otra parte, el conocimiento de la estructura flagelar ha tenido un progreso considerable en los últimos años gracias al desarrollo de nuevas metodologías de purificación, así como a los avances en las técnicas de microscopía electrónica y reconstrucción de imágenes. Debido a esto, se ha podido identificar a otros importantes componentes flagelares de localización citoplásmica.

Las proteínas responsables del cambio de dirección en la rotación flagelar (FliG, FliM y FliN), forman parte de un complejo denominado el "switch". Estas 3 proteínas tienen múltiples funciones: son esenciales para el ensamblaje flagelar, controlan el cambio de dirección de rotación del motor (principalmente FliM) y participan en la generación de la torca (principalmente FliG que interacciona tanto con el anillo MS como con MotA). Hasta hace algunos años, utilizando métodos más sutiles para la purificación del cuerpo basal, se logró identificar una estructura en forma de campana que se proyecta desde el anillo MS hacia el citoplasma (ver Fig 2c). Esta estructura se denominó anillo C o citoplásmico y su estudio inmunológico reveló que está constituido por las tres proteínas del motor/switch mencionadas (7).

El Aparato de Exportación

Las proteínas axiales del flagelo se sintetizan en el citoplasma pero deben ser capaces de llegar a sus destinos finales, ya sea la membrana celular o incluso hasta el exterior. Exceptuando las proteínas de los anillos L y P, las proteínas flagelares no contienen una secuencia señal (líder) en el extremo amino terminal, por lo que no se exportan a través de la vía común Sec, que constituye el mecanismo principal de exportación de proteínas bacterianas. Debido a esto, se propuso la existencia de una vía de exportación específica para el flagelo en la que las subunidades se transportan por el interior de la estructura misma. Las principales evidencias que apoyan esta idea son las siguientes: las proteínas exportadas (del eje, gancho, HAPs y flagelina entre otras) no poseen un péptido señal; se ha demostrado que las subunidades se ensamblan en el extremo distal de la estructura naciente, por lo que

otro mecanismo de exportación sería muy complejo ya que éste implicaría que las subunidades de flagelina recorrieran 10 μm a través del medio sin difundir; y por último, la existencia de un canal central que ha sido identificado por reconstrucción de imágenes tanto en el gancho como en el filamento y que se supone debe existir a su vez en el eje (3).

Por otra parte, se han identificado varias de las proteínas directamente involucradas en el proceso de exportación como FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ y FliR; y se ha demostrado que algunos de los componentes de este aparato exportador se encuentran físicamente asociados al cuerpo basal. A su vez, cabe mencionar que estos polipéptidos muestran una alta similitud con proteínas de otros sistemas de secreción bacteriana como el de exportación de factores de virulencia en bacterias patógenas, conocido como sistema de exportación tipo III (8). De estas proteínas, FliI es una ATPasa que interacciona con los principales componentes del flagelo que se exportan como son: la proteína del gancho (FlgE) y la flagelina (FliC). Por lo tan-

to, se ha propuesto que la hidrólisis de ATP proporciona la energía que se requiere en el proceso de exportación (9).

BIOGÉNESIS

Ensamblaje Flagelar

El camino morfogenético en la síntesis del flagelo ha sido dilucidado a través de diferentes métodos, uno de ellos es el análisis al microscopio electrónico de las subestructuras que se presentan al mutar diferentes genes flagelares. A partir de estos datos se obtuvo la vía morfológica de ensamblaje flagelar que se muestra en la (Fig 3). El ensamblaje procede en una secuencia lineal del extremo proximal al distal, y se lleva a cabo con la adición de monómeros y no de estructuras preformadas, como sucede en el caso de los bacteriófagos (10).

La estructura estable más temprana es el anillo MS que se inserta en la membrana citoplásmica; el ensamblaje de la proteína FliF marca el inicio de la biosíntesis flagelar y forma el núcleo sobre el que se acoplarán todos los demás componentes que se

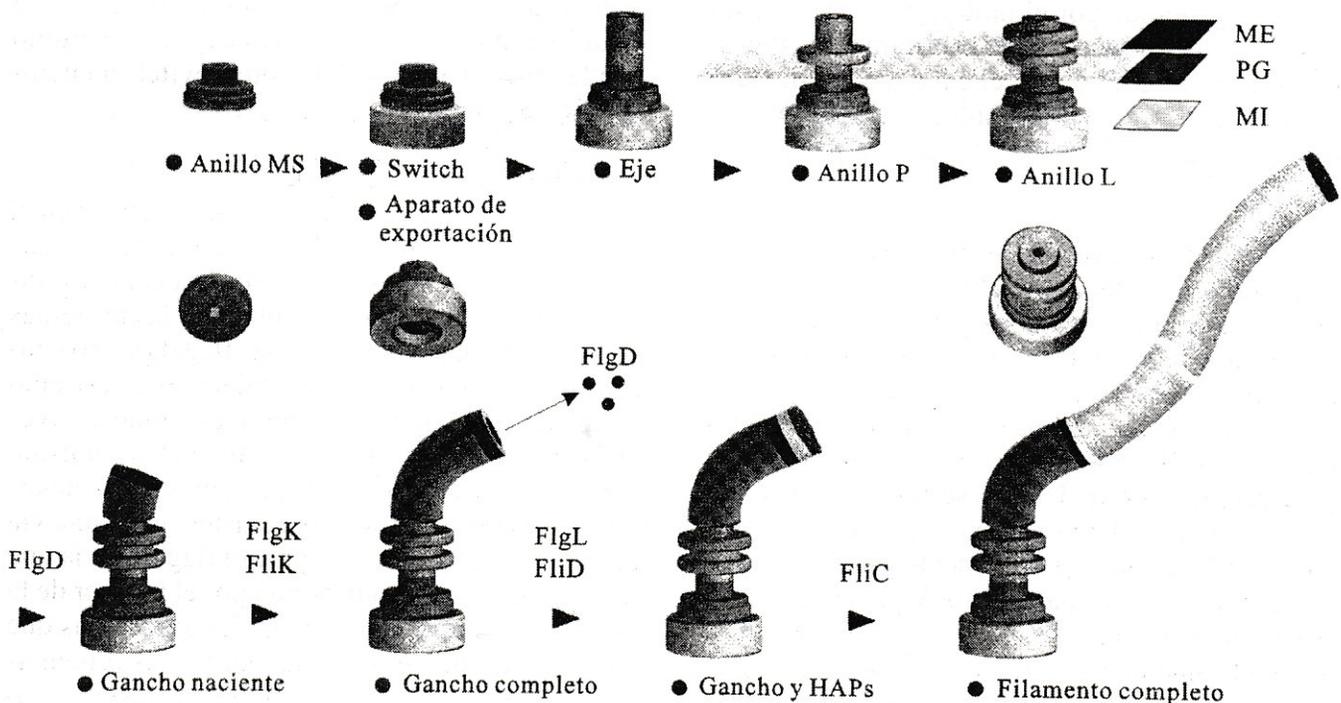


Figura 3. Vía de morfogénesis flagelar. El ensamblaje del gancho requiere de la proteína FlgD que es posteriormente reemplazada por la primera proteína de unión HAP1 (FlgK). FliK determina la correcta longitud del gancho, señal que permite la exportación y ensamblaje de las proteínas tardías.

requieren en la construcción. La siguiente estructura que se puede detectar por microscopía electrónica es el anillo C, formado por el complejo del switch (7). En seguida se incorpora el eje que es el primer componente externo a la membrana citoplásmica. Como se mencionó, las diferentes proteínas que constituyen la estructura del eje no presentan un péptido señal, por lo que antes de llegar a este punto del camino biosintético, se requiere ya de la formación y correcta localización de las proteínas que integran el aparato exportador específico del flagelo. Las 4 proteínas que forman el eje deben estar presentes de forma simultánea pues si alguna falta, éste no se forma (5,10). Recientemente se identificó la actividad de la proteína FlgJ como la de una muramidasa encargada de hidrolizar la capa de peptidoglicano permitiendo así la formación del eje (11).

A continuación, el gancho comienza a crecer sobre el extremo distal del eje, hasta ser obstruido físicamente por la membrana externa. Para sobrepasar dicha barrera, se tienen que ensamblar los anillos L y P que generan un hueco en la membrana por el que pasarán las subunidades de la proteína del gancho (FlgE). Este par de anillos externos se une a través de un mecanismo desconocido, formando un complejo cilíndrico muy estable. Como se mencionó, las proteínas FlgH y FlgI, a diferencia de las demás proteínas flagelares que atraviesan la membrana citoplásmica, se exportan a través del sistema general de secreción en el que participan las proteínas Sec. El ensamblaje del anillo P requiere además de la proteína FlgA, que se cree puede funcionar como una chaperona (10).

Posteriormente, se ensambla el gancho, cuya formación requiere de la proteína FlgD, que se incorpora en el extremo distal del eje y acompaña el ensamblaje del gancho. Sin embargo, FlgD no forma parte de la estructura final del flagelo, sino que es reemplazada por la primera proteína accesorio de unión HAP1. El gancho se elonga hasta un tamaño determinado, siendo la proteína FliK la encargada de regular la longitud de este polímero. Mutaciones en el gen *fliK* generan ganchos de tamaños anormalmente grandes denominados "poliganchos" (12). Estudios recientes han demostrado que FliK requiere ser exportada para ejercer su función (13); sin embargo, aún no se comprende el

mecanismo preciso mediante el cual actúa esta proteína.

Por último, se exportan las proteínas tardías: HAPs (FlgK, FlgL, FliD) y la flagelina. La proteína HAP2 acompaña el ensamblaje de las subunidades de flagelina en la parte distal del filamento. Sin esta proteína (FliD), las subunidades no polimerizan, sino que se liberan en forma soluble al medio extracelular. En cuanto a las proteínas Mot, éstas pueden incorporarse tardíamente cuando el flagelo está ya completo, lo que ha sido demostrado en experimentos en los que se controla la inducción de los genes *mot* (3,5,10).

Para que este proceso biosintético proceda correctamente debe existir un control tanto en el orden de exportación de las diferentes proteínas, como en el número de subunidades a ser secretadas. Una parte de este control se da a nivel de expresión génica; sin embargo, por mencionar un ejemplo, los genes del eje y del gancho están sujetos al mismo control transcripcional, por lo que debe existir otro mecanismo de regulación. Se ha propuesto que la estructura flagelar naciente es la que determina cuál proteína debe exportarse; sin embargo, aún se desconoce cómo es que el aparato de exportación puede sentir el estado de ensamblaje de la estructura externa del flagelo. Esta es una de las preguntas de mayor interés en el estudio de la biogénesis del flagelo.

Durante esta vía de morfogénesis flagelar existen varios puntos de regulación, uno de ellos implica a la proteína Flk que actúa durante el ensamblaje de los anillos L y P (ver más adelante) y otro punto de control lo determina la elongación del gancho. Cuando la formación del gancho se completa, existe una señal que llega al aparato de exportación, el cual cambia su especificidad favoreciendo la exportación de las proteínas tardías (14).

Regulación Genética

Debido a la complejidad estructural y funcional del flagelo, existen más de 50 genes que participan en los diferentes procesos de ensamblaje, estructura, regulación, función (rotación flagelar) y táxis (recepción y transducción sensorial). La complejidad de este sistema se pone de manifiesto si se le compara con el sistema ribosomal bacteriano, que

es el único que contiene un mayor número de genes.

La biosíntesis del flagelo es un proceso energéticamente muy costoso para la célula y es por esto que existe un estricto control de la expresión de los genes flagelares, principalmente a nivel transcripcional. Estos genes se encuentran organizados en operones que forman un sistema coordinado de expresión, denominado regulón, en el que la jerarquía transcripcional se representa en 3 clases. Esta regulación se encuentra acoplada con el proceso de morfogénesis flagelar (Fig 4) (6,14).

Clase 1. Contiene los genes del denominado operón maestro (*flhC-flhD*), que constituye el extremo superior de la jerarquía reguladora, siendo el responsable de la expresión de todos los genes flagelares. Los productos de los dos genes de este operón forman un complejo heteromultimérico que funciona como activador transcripcional, diri-

giendo la transcripción de los promotores de los genes de la clase 2 a través de un mecanismo dependiente del factor σ^{70} . Esto explica el por qué las proteínas FlhC y FlhD son indispensables para la biosíntesis flagelar. La expresión de los genes clase 1 está regulada por diferentes señales globales como la temperatura, el grado de superenrollamiento del ADN, fosfolípidos, el producto génico OmpR (que responde a cambios en la osmolaridad), DnaJ, K, GrpE (que responden al choque térmico), la división celular, así como por represión catabólica a través de los niveles de cAMP. Para ejemplificar la importancia de este tipo de regulación, si la concentración de glucosa es alta, lo que indicaría un ambiente nutritivo, disminuyen los niveles de cAMP por lo que el operón maestro no se expresa. Es decir, si la motilidad no se requiere, las 20,000 subunidades de flagelina que se necesitan para construir el filamento (que representan aproximadamente el 8% de la proteína celular total), no se sintetizan (3,14).

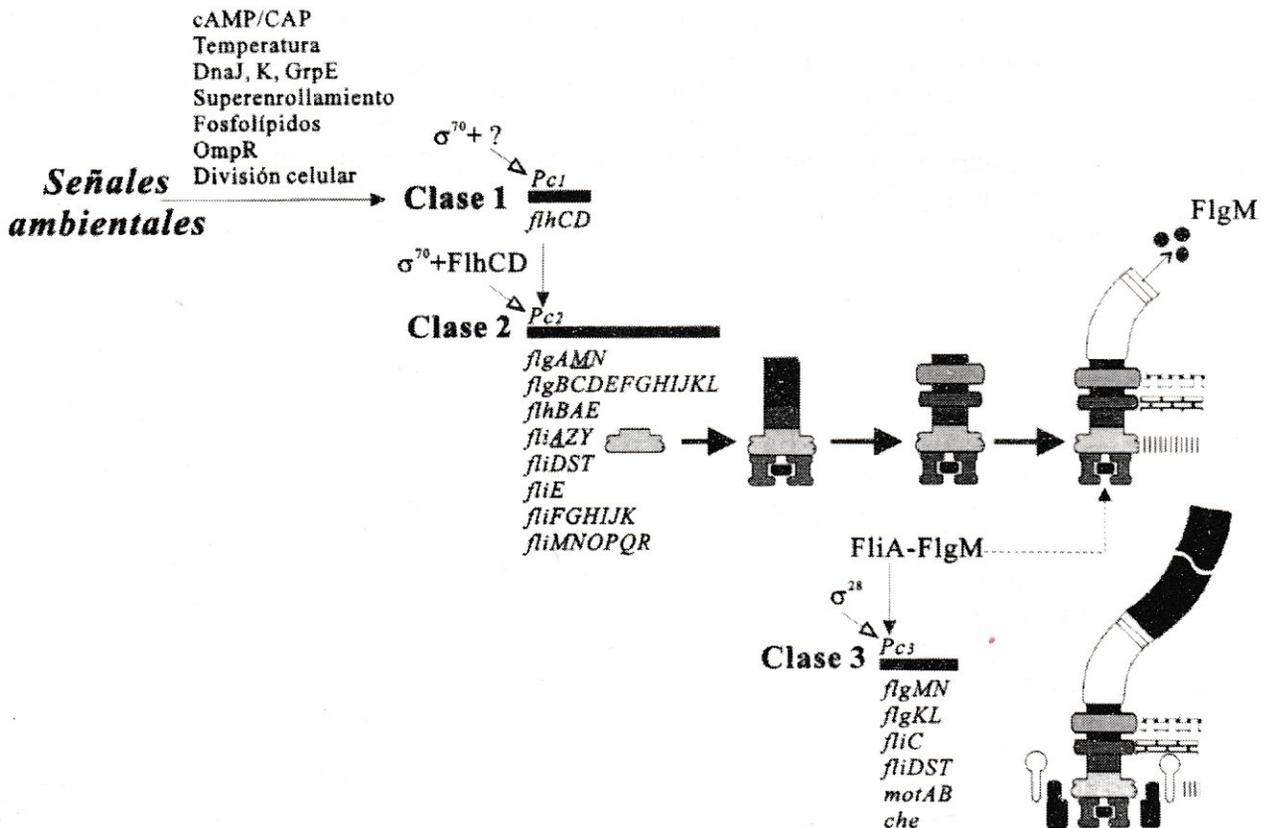


Figura 4. Jerarquía transcripcional del regulón de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* que muestra el acoplamiento entre expresión génica y ensamblaje flagelar, a través del sistema FliA/FlgM. La expresión de los genes de la clase 2 requiere de los productos de la clase 1 y la expresión de los genes clase 3 depende tanto de la clase 1 como de la 2.

Clase 2. Contiene los genes que codifican para las proteínas que forman el gancho y el cuerpo basal, además de dos genes reguladores: *fliA* y *flgM*. El gen *fliA* codifica para un factor de transcripción alternativo, σ^{28} , el cual dirige la transcripción de los genes de la clase 3; mientras que el gen *flgM* codifica para un factor anti-sigma (15).

Diversos procesos celulares se encuentran controlados por factores sigma alternos, que permiten la expresión diferencial de un conjunto de genes en particular. Sin embargo, este tipo de expresión génica específica, genera el problema de eliminar o inactivar un factor sigma alternativo cuya función ya no sea necesaria. Recientemente, el concepto de factor anti-sigma surge como parte de un mecanismo general de regulación transcripcional en los sistemas procariotes. En el sistema flagelar, el factor anti-sigma FlgM, regula negativamente la transcripción de los genes clase 3 uniéndose al factor sigma FliA, previniendo así que éste se asocie con la ARN polimerasa (14,15).

Clase 3. En ésta se encuentran los genes que codifican para las proteínas tardías que se requieren para la formación del filamento, así como los que codifican para las proteínas involucradas en la quimiotaxis y aquellas necesarias para la rotación del motor. Dentro de esta clase, existen operones cuya expresión depende tanto del operón maestro como del factor sigma FliA y otros que requieren únicamente de σ^{28} , como la flagelina (ver Fig 4).

La expresión de los genes se encuentra coordinada con el ensamblaje del flagelo a través del sistema FliA/FlgM. La delección de cualquiera de los genes de la clase 2 inhibe la expresión de los genes clase 3, o dicho de otra forma, se requiere de la expresión de todos los genes clase 2 para que se expresen los operones clase 3. La respuesta para esta observación fue durante mucho tiempo un enigma, hasta el descubrimiento de que la proteína FlgM se exporta. La vía de exportación específica del flagelo fue adoptada por FlgM para eliminarse de la célula, liberando así a FliA, que puede entonces unirse a los promotores de la clase 3. Este factor anti-sigma se expele al medio de cultivo en un estado del ensamblaje en particular, cuando concluye la biosíntesis del gancho (ver Fig 4). De esta forma, si cualquiera de los genes del gancho y el

cuerpo basal es defectuoso, FlgM se queda dentro de la célula inhibiendo a σ^{28} ; mecanismo que evita que la célula desperdicie su energía en la síntesis de flagelina bajo condiciones en las que ésta no se pueda exportar y/o ensamblar (3,15).

Otro tipo de regulación se da durante el ensamblaje de los anillos L y P. La formación de estos anillos externos se encuentra acoplada con la traducción de FlgM, a través de la proteína reguladora Flk. Al sentir el ensamblaje de dichos anillos, Flk inhibe la traducción del ARN mensajero de FlgM, a través de un mecanismo desconocido. Esto incrementa la tasa σ^{28} /FlgM por lo que existe una transcripción basal de *fliC* (flagelina) mientras el gancho se elonga. Una vez que el gancho se completa, FlgM sale de la célula, permitiendo así la síntesis de la flagelina en su totalidad (16).

QUIMIOTAXIS

El Nado

Las bacterias se mueven a través de una serie de nados, interrumpidos por períodos de reorientación. En especies multiflageladas como *E. coli* y *S. typhimurium*, el nado es el resultado de la rotación de cada flagelo y se produce cuando los filamentos rotan en contra de las manecillas del reloj (CCW); la reorientación se produce por una rotación de los filamentos a favor de las manecillas del reloj (CW) (3).

Debido a que el flagelo es una hélice izquierda, cuando los filamentos rotan en dirección CCW, se genera una fuerza de propulsión. Los filamentos se ordenan en una trenza unitaria que sirve como propela a la célula, produciéndose el nado en una trayectoria relativamente lineal. Este conjunto de filamentos logra impulsar a la bacteria a velocidades de hasta 40 $\mu\text{m/s}$ lo que equivale a aproximadamente 20 cuerpos celulares por segundo. Sin embargo, al rotar los filamentos en sentido CW, la trenza se deshace llevando a la célula a presentar movimientos al azar en los que se reorienta sin que exista desplazamiento. En la rotación CW, cada filamento trabaja de forma no coordinada, generándose fuerzas en diferentes direcciones por lo que no hay una velocidad neta (Fig 5). Por lo tanto, ya que la dirección de la rotación flagelar

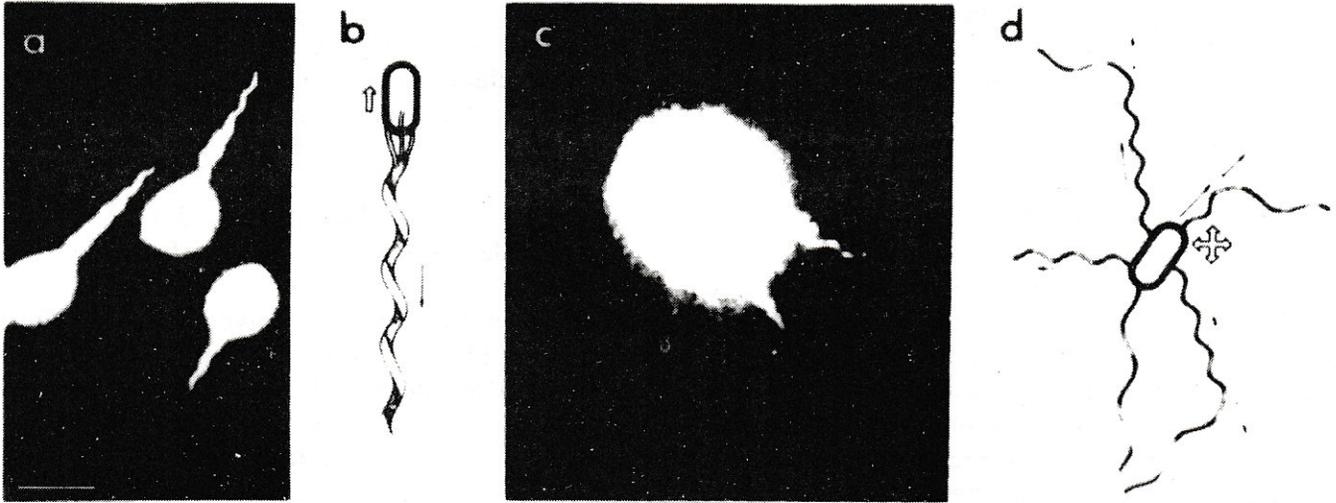


Figura 5. Rotación bidireccional de los flagelos de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. a y b) micrografía de campo oscuro y esquema de la formación de la trenza propulsiva cuando los flagelos rotan en sentido CCW. c y d) cuando los flagelos rotan en sentido CW, la trenza se deshace y el cuerpo celular se reorienta. Las flechas delgadas señalan la dirección de propagación de la onda y las flechas gruesas la dirección del movimiento del cuerpo celular.

determina si la célula avanza o se reorienta, la frecuencia de cambio de dicha rotación será la base de la respuesta táctica (6).

El descubrimiento del fenómeno de quimiotaxis se remonta a finales del siglo XIX, cuando Engelmann y Pfeffer descubrieron la taxis a oxígeno, minerales y nutrientes orgánicos. Por medio de observaciones al microscopio, estos investigadores demostraron que las bacterias en suspensión se acumulaban cerca de una burbuja de aire o de alguna sustancia química introducida en algún punto. A su vez, en 1966, Julius Adler demostró que las bacterias se mueven preferencialmente en la dirección de una mayor concentración de fuentes energéticas como galactosa, glucosa, ácido aspártico, treonina y serina.

En la actualidad, se sabe que el movimiento bacteriano no es azaroso, sino que responde a diversos estímulos ambientales como luz, oxígeno, pH, temperatura, presión, osmolaridad y a la presencia de diferentes compuestos químicos. La respuesta a dichos estímulos se conoce con el nombre general de taxis, lo que permite a la bacteria migrar hacia ambientes más favorables. La quimiotaxis es entonces el proceso mediante el cual las células migran a través de gradientes de concentración de sustancias químicas atrayentes o repelentes. Sin embargo, las dimensiones de una

bacteria son tan pequeñas, que no pueden sentir una diferencia de concentración a lo largo de su cuerpo celular, por lo que integran la información temporalmente, comparando los estímulos sensoriales pasados con los actuales (6,17).

Como se mencionó, la respuesta táctica se basa fundamentalmente en el control de la dirección de la rotación flagelar. Si existe un estímulo positivo como una sustancia atrayente, habrá un mayor tiempo de rotación CCW, extendiéndose de esta manera los intervalos de nado y por tanto siendo menos frecuentes los episodios de reorientación; de esta forma se obtiene un desplazamiento neto hacia el ambiente favorable. Por el contrario, en el caso de un repelente, habrá un mayor tiempo de rotación en sentido CW. Estos cambios en la dirección de rotación del flagelo que producen un determinado comportamiento de nado, se encuentran regulados por un sistema de transducción de señales.

Componentes del Sistema de Transducción

El sistema de transducción en la quimiotaxis bacteriana, como el de muchos otros sistemas biológicos, se encarga de convertir un estímulo extracelular en una señal intracelular dirigida a producir una respuesta.

Los estímulos ambientales son detectados por receptores que son homodímeros que presentan un

dominio sensorial periplásmico y un dominio de señalización citoplásmico, unidos a través de 4 α -hélices transmembranales (Fig 6). Los complejos homodiméricos siempre están presentes, aún en ausencia de ligando. En *E. coli* y *S. typhiumurium* se han identificado varios receptores, cada uno con la capacidad de responder a diferentes estímulos y ligandos. Por ejemplo, uno de los quimiorreceptores más estudiados, cuyo dominio de unión ha sido resuelto por cristalografía, es el denominado Tar, que responde a uno de los atrayentes más poderosos, el L-aspartato, pero también funciona como receptor secundario para maltosa y para los repelentes inorgánicos cobalto y níquel. Estos receptores se regulan a través de reacciones de metilación por lo que se han denominado proteínas MCP (proteínas que aceptan grupos metilo) (6).

La señal que desencadena el proceso de transducción es la disminución en la ocupación del receptor (salida del ligando quimioefector), lo que produce un cambio conformacional en el que se transmite la información hacia el dominio de señalización intracelular que a su vez regula las actividades de los componentes transductores solubles. Existen seis proteínas citoplásmicas denominadas Che (del inglés *chemotaxis*): CheA, CheW, CheZ, CheR, CheB y CheY, encargadas de transducir la

señal desde el receptor hasta el motor flagelar. Este proceso involucra tanto reacciones de fosforilación como de metilación; CheA, CheW y CheZ regulan el nivel de fosforilación de CheY, quien se encarga de interactuar con la proteína FliM del switch flagelar, modulando las frecuencias de nado y reorientación; mientras que CheR y CheB modulan el grado de metilación del receptor (ver Fig 6) (6,17).

Este sistema de transducción presenta dos componentes principales, una proteína histidina cinasa que se autofosforila (CheA) y una proteína reguladora fosfoactivable (CheY). Este es un mecanismo común en una gran variedad de procesos metabólicos y se denomina sistema de señalización de dos componentes.

En la vía de excitación, la liberación del aspartato del receptor resulta en la formación de un complejo ternario: Tar-CheW-CheA, que promueve la autofosforilación de CheA, quien fosforila a CheY en un residuo aspartato. CheY-P interacciona con FliM, lo que induce un cambio en la dirección de rotación del flagelo hacia CW (reorientación celular). Es decir, el aumento en la concentración de atrayente disminuye los niveles de CheY-P por lo que la célula nada (rotación CCW) hacia la condición favorable. La proteína CheZ funciona como una fosfatasa que desfosforila a CheY. Por su parte, el proceso de adaptación se encuentra asociado con la modificación covalente del receptor a través de metilación. CheR es una metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina que metila al receptor cuando existe atrayente, mientras que CheB actúa como una metilerasa que es activada por fosforilación a través de CheA. Gracias a esto, la bacteria es capaz de sentir nuevos estímulos a pesar de haber estado por un determinado tiempo en presencia de ligandos estimuladores, es decir, se habitúa o desensibiliza regresando al comportamiento de nado pre-estímulo (17).

Para concluir, la motilidad a través de flagelos se encuentra ampliamente distribuida en el reino procarionto y le confiere a las bacterias una clara ventaja adaptativa para la supervivencia en su ambiente natural. "Las bacterias pueden vivir sin flagelo, pero con flagelo, viven mucho mejor" (10).

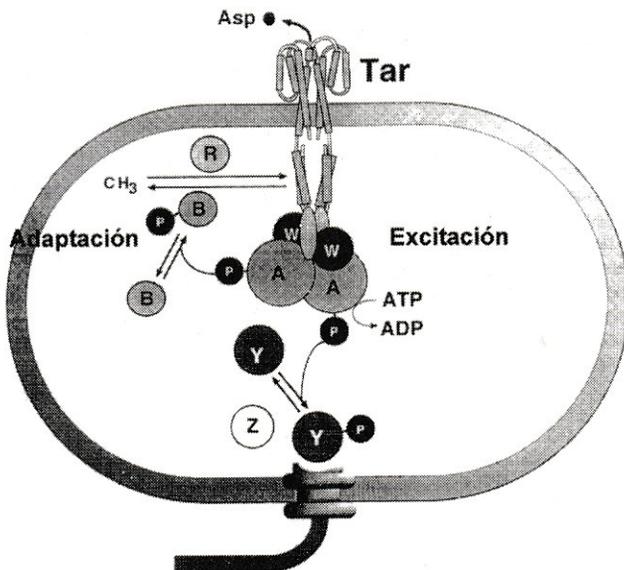


Figura 6. Transducción de la señal quimiotáctica. Eventos que ocurren desde la salida del quimioefector (aspartato) en el receptor, hasta la fosforilación de la proteína que regula la respuesta, al interactuar con la proteína FliM del "switch" flagelar.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera muy especial al Q. F. Javier De la Mora por sus acertadas correcciones al manuscrito así como por toda su gran ayuda con las figuras. Las fotografías de microscopía electrónica de la Figura 1 fueron realizadas por Jorge Sepúlveda, Rodolfo Paredes y Mark West en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Donativo DGAPA IN221598; CONACyT 3290P-N9607.

REFERENCIAS

- Hartzell P L y Youderain P (1995) Genetics of gliding motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Arch Microbiol* 164:309-323.
- Ottemann K M y Miller J F (1997) Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol* 24:1109-1117.
- Macnab R M (1996) Flagella and motility. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, 2nd ed. Editor: Neidhardt F C, Curtis III R, Ingraham J L, Lin E C C, Low K B, Magasanik B, Reznikoff W S, Riley M, Schaechter M y Umberger H E. Am Soc Microbiol, Washington, DC, USA, pp 123-145.
- Blair D F y Dutcher S K (1992) Flagella in prokaryotes and lower eukaryotes. *Curr Opin Genet Develop* 2:756-767.
- Namba K y Vonderviszt F (1997) Molecular architecture of bacterial flagellum. *Quart Rev Biophys* 30:1-65.
- Blair D F (1995) How bacteria sense and swim. *Annu Rev Microbiol* 49:489-522.
- Francis N R, Sosinsky G E, Thomas D y DeRosier D J (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* 235:1261-1270
- Minamino T y Macnab R M (1999) Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol* 181:1388-1394.
- Silva-Herzog E y Dreyfus G (1999) Interaction of FliI, a component of the flagellar export apparatus, with flagellin and hook protein. *Biochim Biophys Acta* 1431:374-383.
- Aizawa S I (1996) Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 19:1-5.
- Nambu T, Minamino T, Macnab R M y Kutsukake K (1999) Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 181:1555-1561.
- González-Pedrajo B, Ballado T, Campos A, Sockett R E, Camarena L y Dreyfus G (1997) Structural and genetic analysis of a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 deficient in hook length control. *J Bacteriol* 179:6581-6588.
- Minamino T, González-Pedrajo B, Yamaguchi K, Aizawa S I y Macnab R M (1999) FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly. *Mol Microbiol* (en prensa).
- Daughdrill G W, Chadsey M S, Karlinsey J E, Hughes K T y Dahlquist F W (1997) The C-terminal half of the anti-sigma factor, FlgM, becomes structured when bound to its target, σ^{28} . *Nature Struct Biol* 4:285-291.
- Brown K L y Hughes K T (1995) The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol Microbiol* 16:397-404.
- Karlinsey J E, Tsui H T, Winkler M E y Hughes K T (1998) Flk Couples *flgM* translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 180:5384-5397.
- Eisenbach M (1996) Control of bacterial chemotaxis. *Mol Microbiol* 20:903-910.

CASPASAS: UNA CASCADA DE PROTEASAS IMPLICADAS EN LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

José Luis Ventura Gallegos, Erika Olivia Gómez González, Alejandro Zentella Dehesa. Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM México D.F. 04510. Fax 56-22-56-11; Correo electrónico: azentell@ifisiol.unam.mx

RESUMEN

Hoy en día se reconocen dos formas de muerte celular, una necrótica causada por factores traumáticos, y otra apoptótica, que se lleva a cabo como resultado de la activación de un programa de muerte. Las primeras evidencias de la existencia de este programa vinieron de los estudios genéticos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, donde se identificó a un grupo de genes esenciales para la muerte celular. Entre estos, el gen *ced-3* resultó codificar para una aspartil-cisteinil proteasa con similitud a la proteasa de humano ICE (convertasa de IL-1 β). Posteriormente, se ha descrito una larga lista de proteasas que se han agrupado en una familia de proteasas relacionadas a ICE y a CED-3, a las que se llama actualmente **caspasas** (cisteinil-aspartil acid proteinases). Como muchas otras proteasas, las caspasas están presentes en forma de zimógenos (pro-caspasa) hasta que una señal las activa. Hasta ahora, se han reportado al menos 3 mecanismos responsables de su activación, uno llevado a cabo por la granzima B, otro dependiente de la activación de los receptores de TNF o de Fas y otro independiente de granzima B y de receptor. Una vez que las primeras caspasas han sido procesadas y activadas, éstas desencadenan una señal en cascada activando a otras caspasas. La activación de esta cascada de amplificación trae como consecuencia la inactivación de un gran número de proteínas estructurales, de señalización, reguladoras de transcripción y del metabolismo de ácidos nucleicos, que desemboca en la muerte de la célula. Los avances en este campo han permitido dilucidar algunos mecanismos virales y celulares que inhiben a estas enzimas. El balance entre los mecanismos de activación e inhibición de las caspasas está directamente relacionado con el control de la muerte por apoptosis por lo que alteraciones en este equilibrio podrían jugar un papel importante en la aparición y evolución de enfermedades degenerativas.

PALABRAS CLAVE: apoptosis, proteolisis, TNF, FAS

ABSTRACT

Currently two types of cell death processes have been described, necrosis, caused by traumatic factors and cell poisoning, and apoptosis, a physiological process that results from the activation of a genetic program for cell death. The evidences that demonstrated the existence of such a program came from studies on *Caenorhabditis elegans*. In this nematode, a group of genes were identified that are necessary for cell death to occur. *ced-3* is one of these proapoptotic genes that encodes an aspartil acid protease with homology to the human Interleukin-1 β -Converting Enzyme (ICE). Today a large family of such proteases, called **caspases** (cisteinil-aspartil acid proteinases) has been identified. Like many other proteases, the caspases are synthesized as inactive proenzymes until they are activated by proteolytic processing. There are at least 3 mechanisms responsible for caspase activation: one through granzyme B, another induced by TNF receptors or Fas, and the last one is independent of ligand or granzyme B. When caspases are activated a signal cascade is turned on which activates other caspases. As a consequence of this activation there is the proteolytic processing of many structural, signaling and transcriptional regulatory proteins. The cleavage of these proteins leads to cell death. Current advances in this field have uncovered some viral and cellular mechanisms that inhibit caspases and block apoptosis. The imbalance between the activation and inhibition of caspases appears to have a strong impact in the loss of control of apoptotic cell death associated with degenerative diseases.

KEY WORDS: apoptosis, proteolysis, TNF, FAS

INTRODUCCIÓN

A principios de los 70's Kerr, Wyllie y Currie (1), describieron que existen al menos dos formas distintas de muerte celular: la necrótica, comúnmente rápida y ocasionada por factores traumáticos, y la que ellos llamaron apoptosis, la cual es más prolongada y morfológicamente distinta. Actualmente, sabemos que existe una serie de diferencias morfológicas, bioquímicas y moleculares entre ambos tipos de muerte, entre las que destaca la activación de las caspasas.

La apoptosis es un proceso importante en una amplia variedad de sistemas biológicos como son: el recambio normal de células (piel, intestino), el desarrollo del sistema inmune, la eliminación de células infectadas con virus, el desarrollo embrionario, la metamorfosis y la atrofia hormono-dependiente. En este último caso la sobrevivencia de las células depende de una hormona o un factor trófico como es el caso de las neuronas simpáticas que requieren del factor de crecimiento neural (NGF). En general, la muerte celular apoptótica ocurre en dos fases: primero hay una fase de activación durante la cual la célula queda comprometida a morir, seguida por una fase de ejecución, en la cual se pueden observar los cambios más dramáticos de la muerte celular. Mientras que la fase de activación presenta muchas variantes, la fase de ejecución tiene características comunes en casi todos los tipos celulares. En la última etapa de esta fase se ha propuesto la participación de diferentes proteasas tales como: las calpainas, las serinil proteasas y las enzimas que conforman al proteasoma.

Dos observaciones llevaron a proponer que una o varias proteasas juegan un papel importante en el control o ejecución del programa de muerte. Por una parte, la muerte celular programada en neuronas simpáticas y de precursores de linfocitos B y T puede prevenirse, o al menos retrasarse por la adición de inhibidores de proteasas (4).

Por otra parte, los estudios hechos por el grupo de Horvitz, revelaron la existencia de un programa de muerte celular en el desarrollo normal del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, en el que participan varios genes cuya expresión es esencial para que este proceso ocurra. Uno de estos genes, denominado *ced-3*, resultó codificar para una

aspartil-cisteinil proteasa, la cual muestra gran similitud con la proteasa de mamíferos ICE, responsable de la maduración proteolítica de la interleucina-1 β (IL-1 β) (2). Más aún, por medio de experimentos de complementación genética de nemátodos carentes de genes funcionales de *ced-3* se demostró que el gen que codifica para ICE es capaz de remplazar a *ced-3* en el programa de muerte. Estos experimentos dieron la primera evidencia contundente de la participación de una o varias proteasas en el programa de muerte celular.

Actualmente, a través de técnicas de biología molecular como el tamizaje de bancos de ADNc con sondas de *ced-3* y de ICE, o por medio de reacciones de transcripción reversa y amplificación por PCR, la familia de proteasas relacionadas con ICE y CED-3 ha crecido y tiene ahora más de una docena de miembros. Con el fin de unificar la nomenclatura a este grupo de enzimas se les ha llamado **caspasas** (cisteinil-**aspartil acid** proteinases) por tratarse de proteasas ácidas que tienen un residuo de cisteína en el sitio activo y que reconocen un residuo de ácido aspártico en el sitio de corte (Tabla I y Fig 3) (3).

GENERALIDADES

Excepto por las caspasas -8, -9, -10 y -12, las demás enzimas presentan conservada la secuencia del sitio activo alrededor de la cisteína que cataliza la hidrólisis del enlace peptídico (Tabla I). Sin embargo, el uso de péptidos con fenil-metil-cetonas (fmk) como inhibidores específicos de la reacción, ha permitido distinguir una enzima de otra, con base en la susceptibilidad a los diferentes péptidos inhibidores que portan este grupo fmk en su extremo carboxilo (Tabla I).

Al igual que muchas otras proteasas, las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos, los cuales son activados por proteólisis, proceso que permite la maduración a proteínas con plena actividad enzimática.

Las caspasas maduras están constituidas por una subunidad grande de aproximadamente 20 kDa, que contiene el sitio activo y una subunidad pequeña de 10 kDa importante para la actividad enzimática (Fig 1A). Ambas subunidades resultan de un mismo zimógeno que requiere de al menos

TABLA I

MIEMBROS DE LA FAMILIA DE LAS CASPASAS

CASPASA	PM	HUMANAS	MURINAS	SITIO ACTIVO	SECUENCIA DE CORTE	CrmA	Y	D	Z
1	46	ICE	ICE	QACRG	WFKD↓S, FEDD↓A	+++	++	-	+
2	47	ICH1	IHO-F/ NEDD2	QACRG	DQQD↓G, EESD↓A	+	-	++	-
3	32	CPP32/YAMA/ APOPAINA	IHO-D	QACRG	IETD↓S	+	++	+++	+
4/11	43	ICE _{REL} II/ICH2/ TX	IHO-A/ ICH3	QACRG	WRVD↓S, LEED↓A	+++	-	-	+
5		ICE _{REL} III/TY		QACRG	WRVD↓S, LEAD↓S	?	?	?	?
6	32	Mch 2	IHO-E	QACRG	DVVD↓N, TEVD↓A	++	-	+++	++
7	36	ICE LAP3/Mch3/ CMH-1	IHO-B	QACRG	IQAD↓S	+	-	+++	-
8	55	MACH/Mch5/ FLICE		QACQG	VETD↓S, LEMD↓S	+++	?	?	+++
9	46	ICE LAP6/ Mch6		QACGG	DQLD↓A	?	?	?	?
10	55	Mch4		QACQG	SQTD↓V, IEAD↓A	+	?	?	?
12	48		Mch4	QACRG	?	?	?	?	?
H	31		IHO-H	QACRG	?	?	?	?	?

En la 1ª columna se presenta el número o letra con la que se designa hoy en día a cada miembro de la familia; la 2ª columna presenta el peso molecular (kDa) de los zimógenos; la 3ª columna, los nombres dados originalmente a las caspasas humanas; la 4ª columna, las enzimas homólogas descritas en ratón. Las letras ACDEFGIKLMQRSTVW corresponden a las abreviaturas convencionales de aminoácidos. El residuo de cisteína catalítica aparece en negritas en la secuencia QACRG. Las letras seguidas de la flecha ↓ indican el enlace peptídico que escinde la enzima. En las últimas columnas se presenta la susceptibilidad de cada enzima a ser inhibida por la serpina de origen viral crmA o por los péptidos sintéticos YVAD (Y), DEVD (D) y zVAD (Z). Inhibición potente (+++), inhibición media (++), inhibición pobre (+), sin efecto (-), inhibición no conocida (?).

dos cortes proteolíticos para su maduración. El primer corte elimina un pro-dominio en el extremo amino del zimógeno y el segundo corte genera las dos subunidades que conforman el sitio activo (4). Con base en la estructura de los zimógenos las caspasas se han clasificado en tres grandes grupos o subfamilias (Fig 1B).

MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE CASPASAS O CASCADAS DE PROTEASAS

Las cascadas de proteasas son sistemas de amplificación, en los que un estímulo inicial activa a un zimógeno favoreciendo su maduración a una enzima activa. El primer grupo de enzimas activa a un

segundo grupo de zimógenos y así sucesivamente, amplificando el estímulo. Otro ejemplo de un sistema de amplificación de proteasas similar a éste, está representado por la activación del sistema de complemento que lleva a la coagulación.

Se han descrito 3 vías de activación (5,6). La primera resulta de la activación de caspasas cascada arriba, ya sea por las mismas caspasas o por la enzima granzima B (5), la cual es la única proteasa de mamíferos capaz de procesar pro-caspasas de forma específica. Esta enzima es producida por linfocitos T citotóxicos y explica en parte la alta eficiencia citotóxica de estas células. La segunda

CASPASA

ESTRUCTURA

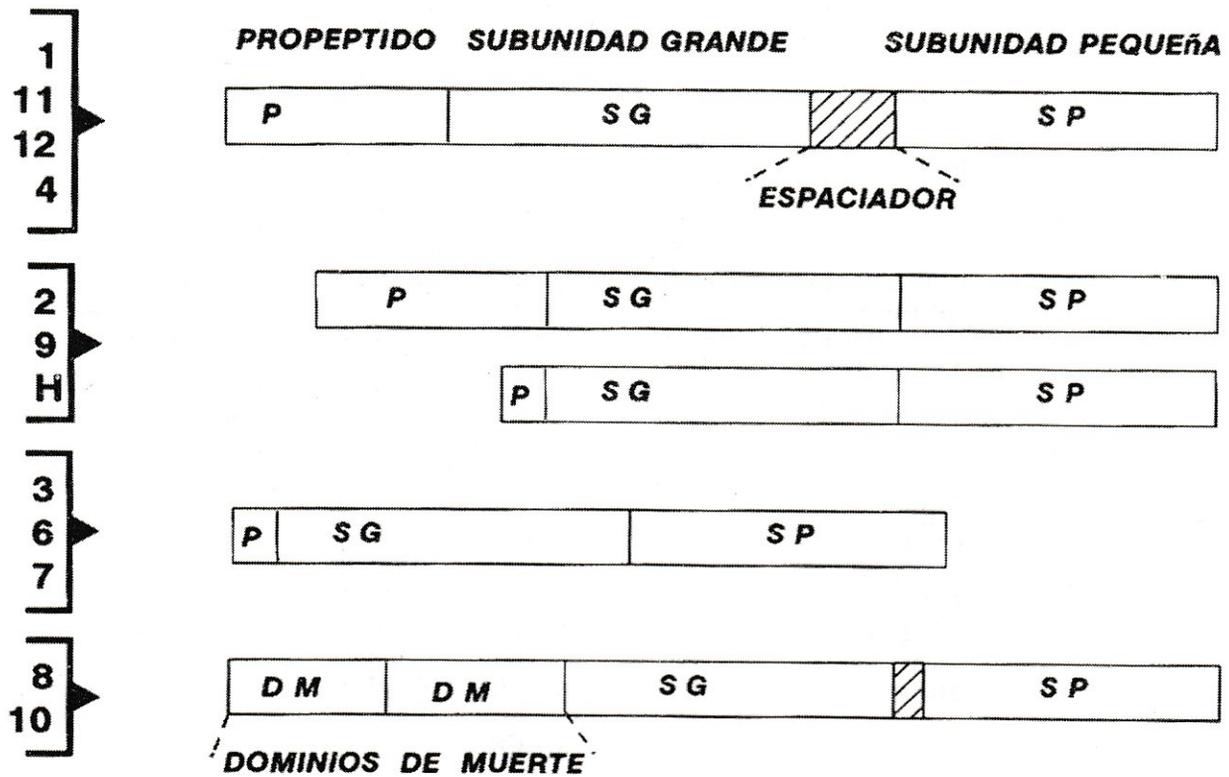


Figura 1A). Organización proenzimática de las caspasas. Las caspasas se sintetizan como zimógenos, que pueden tener un propéptido (P) en su extremo amino, y 2 subunidades, una pequeña (SP) y una grande (SG) que algunas veces están separadas por una secuencia espaciadora. Las enzimas activas son heterotetrámeros compuestos por 2 subunidades grandes y 2 subunidades pequeñas. La caspasa-8 y la caspasa-10, poseen un dominio de muerte asociado a Fas denominado FADD, del inglés "Fas Associated Death Domain (DM)".

es a través de apoptosis inducida vía receptor, como ocurre al estimular receptores de la familia de receptores de citocinas parecidas al TNF; como a Fas/CD95/Apo1, al receptor de TNF p55, a DR3/TRAMP/wsl-1/Apo3/LARD/AIR o a DR4/TRAIL-R1/Apo2 (4-6). Estos receptores contienen dominios de interacción proteína-proteína denominados dominios de muerte en su región intracelular, los cuales acoplan a pro-caspasas vía moléculas adaptadoras. El sistema que mejor se ha caracterizado es el del receptor Fas, donde la activación de los dominios de muerte causa el reclutamiento de la pro-caspasa-8. Cuando esta pro-caspasa se une al dominio de muerte de la proteína FADD que a su vez se encuentra acoplada al receptor, la caspasa-8 es activada, probablemente por autoprocesamiento (Fig 2). La tercera vía por

la cual las caspasas pueden ser activadas requiere de la translocación de citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma y puede ocurrir en respuesta a un aumento en la producción de radicales libres (estrés oxidativo), un aumento en la concentración de calcio [Ca²⁺] en el citoplasma o la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax (7-10). Este evento es tal vez una señal común en las vías apoptóticas independientes de receptor. Una vez en el citosol, el citocromo c interactúa con factores activadores de apoptosis (Apaf). El complejo formado incluye a la pro-caspasa-9, la cual es entonces procesada a la forma activa por autocatalisis. La función específica de la caspasa-9 parece ser la activación de la caspasa-3 que se considera como la caspasa central en la fase de ejecución (Fig 2) (7).

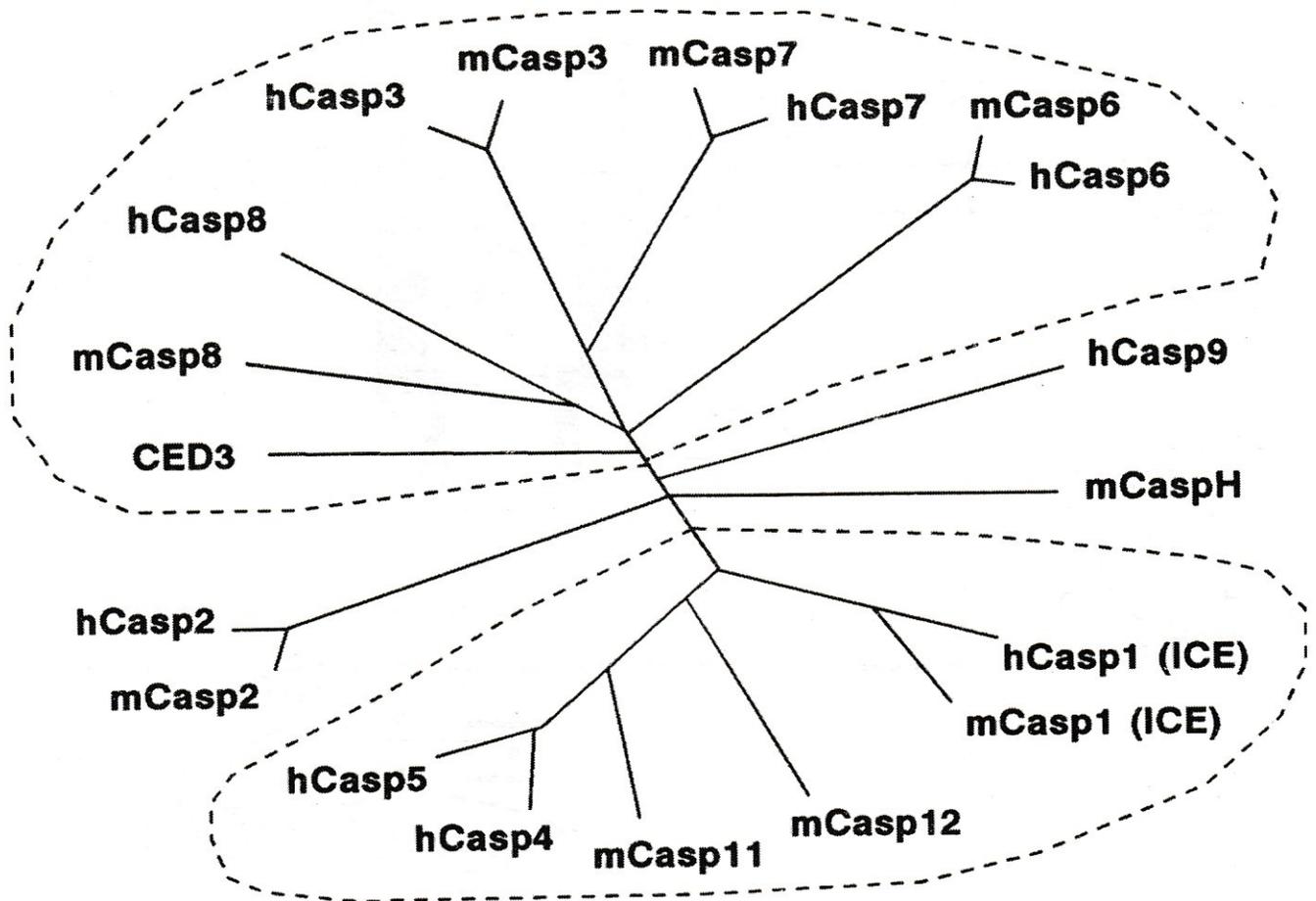


Figura 1B). Dendrograma de caspasas con base en un análisis filogenético de caspasas de ratón (m) o caspasas humanas (h), originadas a partir de un ancestro tipo CED-3. En la misma figura las caspasas son agrupadas en subfamilias, por lo que las caspasas -1, -2 y -5 humanas y -1, -11 y -12 de ratón pertenecen a la subfamilia 1; la subfamilia 2 está integrada por las caspasas -3, -6, -7, -8, -9 y -10 humanas y -3, -6 y -7 de ratón, así como por CED-3 de *Caenorhabditis elegans*; la subfamilia 3 está representada por las caspasas -2 humana y de ratón (tomada de la referencia 3).

Las primeras caspasas que se activan en respuesta a estímulos extracelulares apoptóticos como el TNF o el ligando de Fas son las caspasas -8 y -10. Estudios *in vitro* e *in vivo* realizados con proteínas recombinantes en los que se valoró la capacidad de diversas caspasas para procesar los zimógenos de otras caspasas, reveló que las caspasas -8 y -10 pueden activar a zimógenos de las caspasas -1 y -3 (4). Estos estudios coinciden con la proposición de la existencia de dos etapas del proceso de muerte en las que se requiere la activación de caspasas: La primera es una etapa temprana de activación o de compromiso del proceso de muerte y en ella se activan las caspasas -8 y -9. La segunda etapa se encuentra en un punto tardío del programa al que también se le denomina

fase de “ejecución”; en esta etapa se requiere de la activación de las caspasas -3 y -7. En ambas etapas la activación de las caspasas es secuencial como se ilustra en la Figura 2.

MECANISMO DE REACCIÓN

Las proteasas rompen enlaces peptídicos en los extremos y en el interior de la cadena de las proteínas que les sirven como sustratos. Dependiendo del tipo de proteasa la actividad puede ser inespecífica cortando cualquier enlace peptídico o bien estar restringida a la vecindad de secuencias específicas. Desde este punto de vista las caspasas pueden ser consideradas como enzimas de restricción ya que catalizan la hidrólisis de un enlace peptídico sólo cuando se encuentra

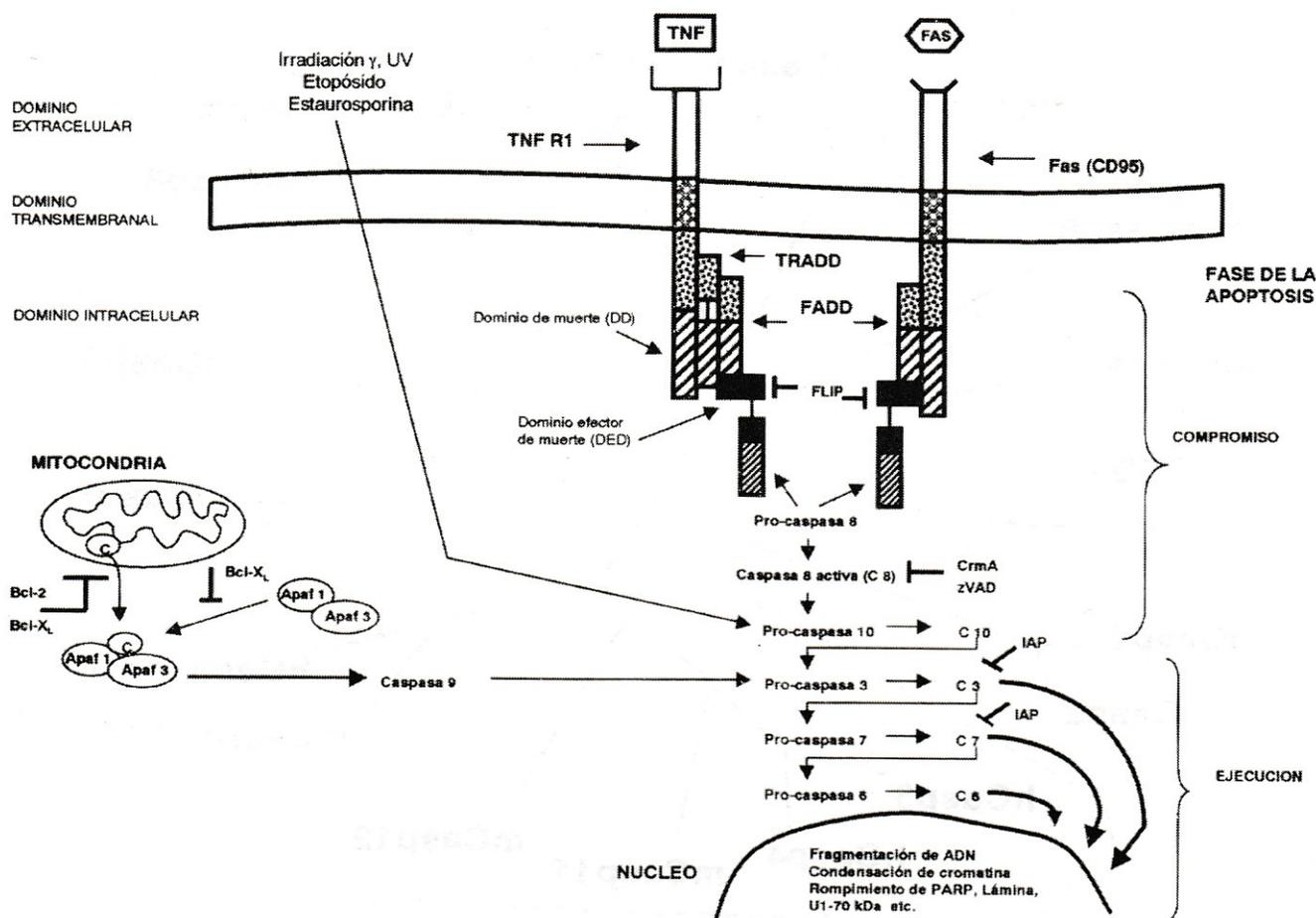


Figura 2. Secuencia de activación de las caspasas y su participación en la transducción hacia la apoptosis. Representación esquemática de señales apoptóticas que inducen la activación de caspasas tales como: drogas (staurosporina), agentes que dañan al ADN (etopósido, irradiación γ , UV etc), y factores apoptóticos como TNF o FAS (ligando), los cuales producen su señalización a través de receptores de membrana (TNF-R1 o Fas/CD95), que a su vez interactúan con proteínas intracelulares con dominios de interacción proteica denominados también de muerte (DD) como la proteína TRADD, y/o dominios efectores de muerte (DED), como las proteínas FADD y la pro-caspasa-8 (MACH/FLICE), finalizando con la activación de la caspasa-8, la cual puede activar a todas las caspasas conocidas por procesamiento proteolítico. La caspasa-10 quizá sea activada por factores que dañan al ADN, y también es capaz de procesar a todas las caspasas conocidas. La caspasa-9 es activada a través de la liberación mitocondrial de citocromo c/Apaf 2 (C) y factores activadores de apoptosis (Apaf), que se asocian a Apaf 3 que es la pro-caspasa-9. En la misma figura se representan a inhibidores de la apoptosis y el punto en el que inhiben (\perp); estas proteínas son Bcl-2, Bcl-X_L, CrmA, FLIP, IAP y el péptido zVAD (véase inhibidores de caspasas en el texto). Parte de este esquema está basado en estudios *in vitro* con caspasas y proteínas recombinantes, y requiere confirmación en sistemas celulares intactos.

próximo a un residuo de ácido aspártico dentro de una secuencia específica (Tabla I). Estas enzimas tienen un sitio que reconoce a la secuencia diana y un sitio activo en cuyo centro catalítico se encuentra un residuo de cisteína y uno de histidina (4). El sitio que reconoce al residuo de ácido aspártico es el que le confiere especificidad a la enzima y permite que se una al péptido de manera tal que el enlace peptídico que debe ser hidrolizado quede alineado con el sitio activo (Fig 3).

La reacción sigue un mecanismo común a las enzimas que presentan un residuo nucleofílico en su centro catalítico, como son los residuos de cisteína, serina e histidina. Estos residuos presentan un orbital con un par de electrones responsables de llevar a cabo un ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico, considerado como un paso crítico para la catálisis. El rompimiento del enlace peptídico ofrece una gran barrera energética que es salvada por medio de la formación de un enlace

covalente entre el grupo tiol del residuo de cisteína con el grupo carbonilo del enlace peptídico que es hidrolizado. El intermediario covalente que se forma es la enzima unida al grupo acilo del péptido ya cortado. Este intermediario es inestable y por tanto más propenso a reaccionar con un hidroxilo que sirve como el aceptor final del grupo acilo de lo que sería el enlace peptídico sin alteración. Por esta razón, las caspasas, al igual que la mayoría de las proteasas son en realidad enzimas que transfieren grupos acilo, más que simples hidrolasas. A este grupo de acil transferasas pertenecen proteasas, como la papaina e incluso otras enzimas como la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa o la acetil CoA transferasa.

SUSTRATOS CELULARES DE LAS CASPASAS

La activación de pro-caspasas durante la muerte celular apoptótica ha sido relacionada con el rompimiento de proteínas citoplasmáticas y nucleares. Actualmente, es difícil ofrecer una lista completa de todas aquellas proteínas que son procesadas por

caspasas, puesto que a cada momento se conocen nuevos sustratos. En la Tabla II presentamos una lista de algunos de los sustratos mejor caracterizados que se han agrupado en proteínas estructurales, proteínas de señalización, proteínas reguladoras de transcripción y proteínas involucradas en el metabolismo de ADN/ARN (11). En esta lista se omiten algunas proteínas como la IL-1β, la cual es procesada por la caspasa-1 pero cuyo procesamiento es importante en la respuesta inmunológica, y proteínas que son degradadas durante la muerte celular pero cuya proteólisis no ha sido atribuida a caspasas, como la proteína NuMa, un componente de la matriz nuclear, ni las topoisomerasas I y II.

Durante la fase de ejecución de apoptosis las caspasas parecen tener un efecto redundante, ya que estas procesan a los mismos sustratos, por lo que no se sabe si *in vivo* existen caspasas específicas para un sustrato determinado. Muchos de los sustratos que se presentan en la Tabla II son procesados por las caspasas -3, -7.

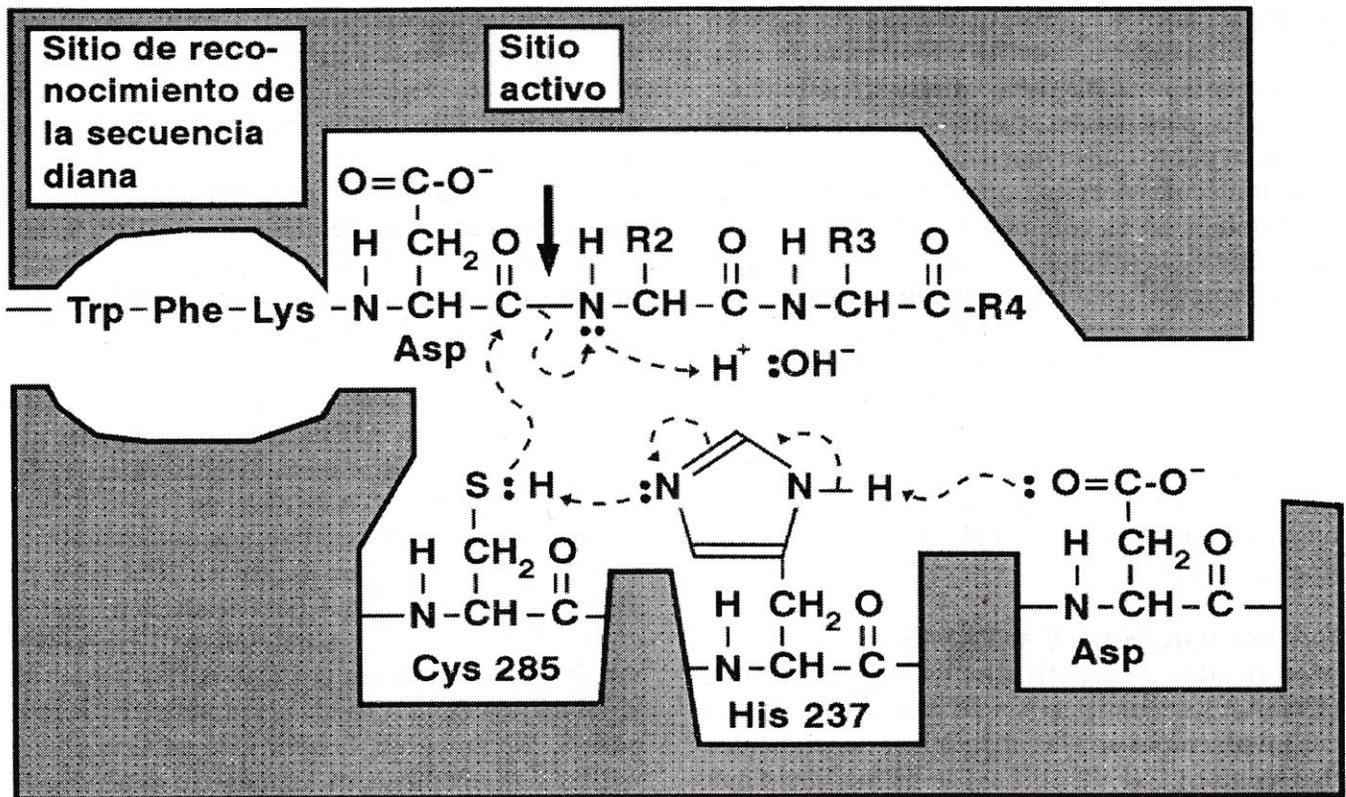


Figura 3. Mecanismo de corte de una caspasa, mostrando el papel de un residuo de ácido aspártico (Asp) y de uno de histidina (His) en la activación del residuo de cisteína (Cys), responsable del ataque nucleofílico sobre el carbonilo del enlace peptídico que sigue un residuo de ácido aspártico en el péptido sustrato.

Por otro lado, con base en la progresión de eventos hacia la muerte celular podríamos categorizar a los sustratos de las caspasas en 3 grupos: a) otras caspasas, b) proteínas celulares que necesitan ser inactivadas para que la muerte celular ocurra, y c) proteínas celulares cuya activación es requerida para la ejecución de la muerte celular. El primer grupo incluye a las formas proenzimáticas de las caspasas (las pro-caspasas-1, 3, 6, 8, 10 etc). El segundo grupo de sustratos incluye a la poli-ADP-ribosil polimerasa (PARP), la ribonucleoproteína pequeña U1 (U1-70 KDa), la cinasa de proteínas dependiente de ADN (DNA-PK), el inhibidor de la disociación de GDP tipo 4 (D4-GDI), el producto del gen de retinoblastoma (RB), fodrinas, actina y láminas. La actividad proteolítica de las caspasas sobre estas proteínas resulta en su inactivación funcional, lo cual tal vez sea crítico para la progresión hacia la muerte celular. PARP, U1-70 Kda, DNA-PK son proteínas que participan en la reparación de ADN e intervienen en el empalme de ARNm, mientras que D4-GDI es requerida para la señalización de Rho y de GTPasas asociadas al control del citoesqueleto. La proteína RB participa en la regulación del ciclo celular. Finalmente, la fodrina, la actina y las láminas nucleares son componentes estructurales importantes y necesarios para mantener la forma e integridad de la célula, por lo que la inactivación proteolítica de estas moléculas del citoesqueleto podrían explicar los cambios en el volumen y forma de la célula apoptótica y la involución nuclear. El tercer grupo de proteínas está representado por elementos que participan como efectores en cascadas de transducción. Dentro de estos sustratos tenemos a cinasas de proteínas como PKC ζ , PKC, MEKK1, PITSLRE, SREBPP 1 y 2 y el Factor de Fragmentación de ADN (DFF) (5,12). Se ha propuesto que la inactivación de estas cinasas es un paso importante en la implementación del programa de muerte.

INHIBIDORES DE CASPASAS

Modificador de la actividad de citocina tipo A (CrmA): La identificación de proteasas específicas involucradas en vías apoptóticas dependientes de receptor (TNF-R1 o Fas) se ha facilitado con la identificación de inhibidores de la muerte celular de origen viral y celular, así como con el uso de inhibidores sintéticos (5). Los inhibidores de cas-

pasas identificados en estos experimentos, corresponden a productos de genes virales que previenen la muerte de la célula hospedera. Una nueva clase de genes virales cuyos productos inhiben de forma efectiva la apoptosis, corresponde a CrmA del virus de la viruela (2). CrmA es una proteína de 38 kDa perteneciente al grupo de inhibidores de serinil proteasas (serpinas) que puede bloquear la muerte celular apoptótica mediada por TNF o FAS, aparentemente por formar un complejo estable con diferentes tipos de caspasas (Fig 2) (4). CrmA fue descrito originalmente como un inhibidor específico de la convertasa de IL-1 β (ICE) ahora llamada caspasa-1. La inhibición de la caspasa-1 es un mecanismo que utiliza el virus de la viruela para evitar que la célula hospedera pueda producir IL-1 β , citocina importante en la respuesta inmunológica, y muerte autoinducida. Actualmente se sabe que CrmA tiene la capacidad de bloquear la muerte celular muy probablemente por inhibir una o más caspasas. Mientras que CrmA es un pobre inhibidor de CED-3 y de la caspasas-10, es muy efectivo para la caspasa-8. Para bloquear la muerte celular mediada por FAS o TNF se necesitan bajas concentraciones de CrmA; sin embargo, para bloquear la actividad proteolítica de las caspasas -3 o -7 se requiere de concentraciones mucho más altas. Las caspasas -3 y -7 se hacen proteolíticamente activas cuando se estimula a la célula con FAS o TNF, pero permanecen como zimógenos cuando las células expresan CrmA, aun en presencia de FAS o TNF, sugiriendo que CrmA inhibe a una o más caspasas cascada arriba de las caspasas -3 y -7. Se sabe que las caspasas-8 y -10 pueden procesarse proteolíticamente entre ellas mismas y procesar a otras caspasas. En el modelo actual la caspasa-8 está en el ápice de la cascada apoptótica siendo la primera caspasa en activarse cuando se estimula a las células con FAS o TNF, y es una caspasa muy sensible a la inhibición por CrmA, mientras que para la caspasa-10 se necesita 1000 veces más de CrmA para producir el mismo efecto. Por lo tanto, la inhibición por CrmA en la vía apoptótica mediada por FAS o TNF se debe a la inhibición de la actividad enzimática de la caspasa-8. Sin embargo, la habilidad de CrmA para inhibir a la apoptosis es claramente dependiente del estímulo que se use, puesto que en contraste a la caspasa-8, la caspasa-10 implica una vía que no es sensible a CrmA.

TABLA II

PROTEÍNAS QUE SON PROCESADAS POR CASPASAS DURANTE LA MUERTE CELULAR

PROTEÍNA	FUNCIÓN	SECUENCIA DE CORTE
Proteínas estructurales		
Actina	Componente del citoesqueleto	LVVD/N ELPD/G
Fodrina	Componente del citoesqueleto	?
Gas 2	Componente del citoesqueleto	SRVD/G
Gelsolina		DQTD/G
Keratina 18	Filamento intermedio	VEVD/A
Láminas	Componente nuclear	VIED/N
Proteínas de señalización		
PLA2	Metabolismo de fosfolípidos	DELD/A
D4-GDI	Inhibidor de proteínas G	DELD/S
	LLGD/G	
MEKK-1	Proteína cinasa	DTVD/G
PAK2	Proteína cinasa	SHVD/G
PITSLRE Cinasa	Proteína cinasa	YVPD/S
PKCζ	Proteína cinasa	DMQD/N
Reguladores de transcripción		
MDM2	Inhibidor de p53	DVPD/C
RB	Ensamble de complejo represor	DEAD/G
SREBPs 1,2	Factores reguladores de colesterol	SEPD/S DEPD/s
Metabolismo de ADN/ARN		
DNA-PK	Reparadora de ADN	DEVD/N DWVD/G
HnRNP	Empalme de pre-ARNm	?
PARP	Reparadora de ADN	DEVD/G
RFC140	Replicación de ADN	DEVD/G
U1snRNP	Empalme de pre-ARNm	DGPD/G
Otras		
Ciclina A2	Mitosis	DEPD/C
DDF	Fragmentación de ADN	DETD/S

Abreviaturas tomadas directamente del inglés; D4-GDI, Inhibidor de disociación de GDP tipo 4; DDF, Factor de fragmentación de ADN; DNA-PK, Cinasa de proteínas dependiente de ADN; Gas2, Proteína específica de arresto del crecimiento celular de tipo 2; hnRNP-C, Ribonucleoproteína nuclear heterogénea de tipo C; MEKK-1, Cinasa MEK de tipo 1; PAK2, Cinasa activadora de p21 de tipo 2; PARP, Poli ADP Ribosil Polimerasa; PKCζ, Cinasa de proteínas Cζ; RB, Proteína de retinoblastoma; RFC140, Factor de replicación de tipo C subunidad grande (140kDa); SREBPs, Proteínas que unen elementos en respuesta a esteroides; U1snRNP, Ribonucleoproteína nuclear pequeña U1 (tomada de la referencia 11).

Proteína p35: De manera similar a CrmA el producto del baculovirus de *Autographa californica*, p35 inhibe la apoptosis en células de insecto viralmente infectadas (4). Además, las expresiones ectópicas de p35 en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, así como en células de mamífero también inhibe a la apoptosis. Esta inhibición ha sido atribuida a un bloqueo directo de cas-

pasas, puesto que estudios recientes han sugerido que puede inhibir a las caspasas humanas -8 y -10, a CED-3 de *Caenorhabditis elegans* y a la caspasa-1 del insecto *Spodoptera frugiperda*. Esta observación llevó a pensar que p35 podría interactuar directamente con caspasas. En un trabajo reciente, se demostró que p35 forma un complejo con las caspasas, y que es un inhibidor directo que se une al

sitio activo. Además, p35 se considera un inhibidor específico de caspasas, porque otras cisteinil o serinil proteasas no son inhibidas por esta proteína viral (14). El potente efecto anti-apoptótico de p35 probablemente se deriva de su poca habilidad para discriminar entre caspasas individuales, caso contrario a CrmA la cual tiene preferencia por la caspasa-1 en la inhibición del procesamiento de pro-IL-1 β , y por la caspasa-8 en la vía apoptótica.

La familia de Bcl-2 y el citocromo c en la regulación de la activación de caspasas: Bcl-2 y algunos miembros de su familia (Bcl-X_L, E1b19k, CED9, Bcl-w, Bfl-1, Mel-1) son potentes inhibidores de la muerte celular apoptótica, lo cual hace pensar que interviene en algún punto antes de la activación de las caspasas ejecutoras de muerte celular, como las caspasas -3 y -7.

La familia de Bcl-2 está ampliamente distribuida en distintos tipos celulares; estas proteínas se pueden localizar predominantemente en la parte externa de la membrana mitocondrial, del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear (8). Bcl-2 puede prevenir la liberación de citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma o al medio externo. La liberación de citocromo c (Apaf-2) es esencial para la activación de las caspasas de ejecución (12). Por lo tanto, la presencia de Bcl-2 en la membrana mitocondrial ha llevado a pensar que puede bloquear directa o indirectamente la liberación de citocromo c (12). Además del citocromo c se sabe que para la activación de la caspasa 3 se requiere de otros factores citosólicos que inicialmente fueron designados como factores activadores de proteasas apoptóticas (Apaf) (7). De hecho, basado en su función, el citocromo c fue designado como Apaf-2 y, recientemente, el factor denominado como Apaf-1 se ha identificado como el homólogo de CED-4 (de *Caenorhabditis elegans*), mientras que un tercer elemento llamado Apaf-3 corresponde a la pro-caspasa-9. Estos 3 factores forman un complejo ternario en el citosol, cuya principal función es la de activar a la caspasa-9 (Apaf-3). Otro factor que se ha asociado a la activación de la caspasa-3 es el factor inductor de apoptosis (AIF) que también es liberado de la mitocondria junto con el citocromo c.

Otras evidencias han mostrado que Bcl-X_L puede formar un complejo ternario con Apaf-1 y Apaf-

3 (pro-caspasa-9), lo cual apoya la hipótesis de que la acción anti-apoptótica ejercida por miembros de la familia de Bcl-2 es evitar la translocación de citocromo c (Apaf-2) de la mitocondria hacia el citoplasma (13), además de la capacidad de interactuar con factores apoptóticos como los tipo Apaf. De esta forma, se establece una actividad competitiva y de secuestro del complejo citosólico formado por Apaf-1 y Apaf-3 (pro-caspasa-9), evitando la activación de la caspasa-9 e indirectamente de las caspasas-3 y -7, bloqueando así la fase de ejecución de la apoptosis.

Por otro lado, se ha sugerido la participación de vías independientes de caspasas, en las que la proteína Bax (perteneciente a una familia de proteínas pro-apoptóticas) juega un papel importante.

Inhibidores sintéticos: Con el propósito de distinguir una caspasa de otra y así poder establecer su orden de activación, se sintetizaron algunos péptidos que mimetizan los sitios de rompimiento de las caspasas. Tales péptidos han sido químicamente derivatizados con fluoro metil cetona (fmk) un inhibidor específico de las cisteinil aspartil proteasas y se han utilizados ampliamente en sistemas *in vivo* e *in vitro* para inhibir la actividad de las caspasas. Estos péptidos son hidrosolubles, relativamente estables (vida media de 2-4 h) y generalmente pequeños (3 a 4 residuos de aminoácidos de longitud) e incluyen a zVAD-fmk (bensiloxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluoro metil cetona), DEVD-fmk (acetil-Asp-Glu-Val-Asp-fluoro metil cetona), YVAD-fmk (acetil-Tyr-Val-Ala-Asp-fluoro metil cetona) y VEID-fmk (acetil-Val-Glu-Ile-Asp-fluoro metil cetona) (Tabla I) (5). Las secuencias de estos péptidos está basada en los sitios de reconocimiento de los diferentes tipos de caspasas por sus sustratos. Por ejemplo, YVAD-fmk está basada en el reconocimiento de la caspasa-1 por el sitio de corte en pro-IL-1 β , DEVD-fmk está basada en el sitio donde la caspasa-3 rompe a PARP, y VEID-fmk está basada en el reconocimiento del sitio de fragmentación de la lámina -B1 por la caspasa-6. El péptido zVAD-fmk inhibe la muerte celular apoptótica en una etapa temprana, puesto que interfiere con la aparición de muchas características que marcan la muerte celular por apoptosis, como el rompimiento de PARP por la caspasa-3 y la formación de fragmentos de rompimiento

internucleosomal del ADN. Recientemente se ha mostrado que zVAD-fmk inhibe el procesamiento de las caspasas -2,-3,-6 y -7, sugiriendo que inhibe a una caspasa que está cerca o en el ápice de la cascada de caspasas. Bajo esta visión se ha determinado que zVAD-fmk bloquea a la caspasa-8, la cual como ya hemos dicho está en el ápice de la cascada apoptótica cuando es inducida vía receptor (TNF-R o Fas) (Fig 2). El péptido zVAD-fmk no inhibe la muerte celular inducida por Bax. Sin embargo, zVAD-fmk sí inhibe ciertos fenotipos de la apoptosis como el rompimiento de sustratos citosólicos y nucleares, y la fragmentación de ADN, apoyando la hipótesis de que la muerte celular inducida por Bax no requiere de la participación de caspasas.

Otros péptidos análogos se han derivatizado con amino metil cumarina (amc), un grupo funcional que al ser escindido del péptido, fluoresce evidenciando la actividad de caspasa. Estos péptidos incluyen a YVAD-amc (acetil-Tyr-Val-Ala-Asp-amino metil cumarina) y DEVD-amc (acetil-Asp-Glu-Val-Asp-amino metil cumarina). Por tanto, la actividad de las caspasas puede ser medida por la intensidad de fluorescencia producida por el producto de la amino metil cumarina (4).

Inhibidores de proteínas apoptóticas (IAP): Durante las infecciones virales es común observar el abatimiento de la actividad de caspasa. Como ya hemos mencionado dos de las proteínas virales que han sido ampliamente estudiadas son p35 de baculovirus y CrmA del virus de la viruela, lo que ha llevado a especular que deberían existir equivalentes funcionales de estos inhibidores de proteasas en mamífero.

Los inhibidores de proteínas apoptóticas (IAP) son una familia de proteínas anti-apoptóticas que se encuentran conservadas entre varias especies (15). Los primeros miembros de esta familia fueron identificados en baculovirus (Cp-IAP y Op-IAP). El primer IAP humano identificado fue el inhibidor de proteínas apoptóticas neuronal (NAIP), y fue aislado basándose en el proceso neurodegenerativo de la atrofia muscular-espinal (SMA). En varios individuos con esta enfermedad se ha observado la eliminación del gen *naip*, predominantemente en aquellos con una forma severa de la

enfermedad. Posteriormente, se aislaron 4 IAP's humanos (c-IAP-1, c-IAP-2, X-IAP y sobrevivina), y 2 en *Drosophila* (DIAP-1 y DIAP-2). De manera similar a sus contrapartes virales, cuando los IAP's humanos se expresan ectópicamente en células de mamífero pueden inhibir a la apoptosis inducida por una variedad de estímulos. Sin embargo, X-IAP, cIAP-1 y cIAP-2 son específicas para las caspasas -3 y -7, pero no para las caspasas -1, -8 y -10. Por lo tanto, la selectividad de estos IAP's sugiere que pueden bloquear algunas vías apoptóticas pero no todas.

Recientemente se ha demostrado que XIAP, cIAP-1 y cIAP-2 pueden bloquear la activación de la caspasa-9 dependiente de citocromo c; lo que previene la activación de las caspasas -3, -6 y -7. En contraste, XIAP, cIAP-1 y cIAP-2 no inhiben la proteólisis de la pro-caspasa-3 inducida por la caspasa-8. Sin embargo, estos IAP's pueden bloquear la actividad proteolítica de la caspasa-3 activa (15). Por lo tanto, estas evidencias sugieren que los IAP's pueden bloquear diferentes vías de apoptosis en diferentes puntos de cascada de amplificación.

Proteínas inhibidoras de FLICE (FLIP): El aislamiento y caracterización de genes celulares responsables de mediar las señales de apoptosis (por ejemplo vías de muerte mediadas por caspasas que involucran receptores, adaptadores y proteasas), ha resultado en la identificación de numerosos genes virales que codifican a inhibidores de muerte. Con base en los dominios de interacción proteína-proteína, tales como los dominios de muerte (DD) y del dominio efector de muerte (DED) se han identificado algunos blancos potenciales de inhibidores virales. Basados en esta observación, se han desarrollado bancos de datos como un intento para identificar nuevos genes con dominios que presenten similitud a DED (9). Varios genes virales codifican proteínas con secuencias relacionados a DED capaces de interactuar con el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y/o con el prodominio de muerte de la caspasa-8 (FLICE) cuando se expresan ectópicamente en células de mamífero. Con base en esta característica se han denominado proteínas inhibidoras de la proteasa FLICE (FLIP's) (5). Las similitudes entre las caspasas -8 y -10, incluyendo su prodominio ha

llevado a proponer que estos genes virales también podrían inhibir la señal apoptótica mediada por la caspasa-10.

Como se había pensado en un principio, existen FLIP's celulares que ahora han sido identificadas. Una de ellas denominada FLIP pequeña (FLIP_s), contiene dos dominios DED que son parecidos a la forma viral. La FLIP_s también puede bloquear de manera eficiente la muerte celular inducida por todos los receptores de muerte que se conocen. Sin embargo, en contraste a las FLIP's virales, se ha identificado una proteína humana más grande llamada FLIP grande (FLIP_L), que ha sido llamada proteína relacionada a la caspasa-8 (Casper), inhibidor de FLICE (I-FLICE) y proteína homóloga a caspasa (CASH). Ahora se sabe que FLIP_L/Casper/I-FLICE/CASH es generada por empalme alternativo, y que contiene los mismos dos dominios DED encontrados en la FLIP_s, más un dominio tipo caspasa en el cual un residuo de tirosina ocupa el lugar que normalmente ocupa el residuo de cisteína en el sitio activo. La función exacta de la FLIP_L es controversial, ya que 2 grupos reportan por separado que su sobreexpresión induce o potencia la apoptosis, mientras otros reportan que efectivamente inhibe la muerte. Estas diferencias quizá sean debidas al tipo celular empleado, y a los niveles de expresión de la proteína. Un trabajo reciente indica que la sobreexpresión a niveles no fisiológicos de la FLIP_L fue capaz de inducir muerte celular, mientras que a niveles más bajos esta actividad se pierde.

Debido a la similitud en secuencia entre los FLIP's y la caspasa-8, se ha propuesto que el mecanismo de inhibición de apoptosis es debido a que probablemente los FLIP's compitan con la procaspasa-8 en la unión con su cofactor, FADD, previniendo así su activación.

EVOLUCIÓN DE LA CASCADA DE CASPASAS

La síntesis y degradación de polipéptidos ha representado un paso crítico en la evolución enzimática, si consideramos que en la actualidad, la mayor parte de las funciones celulares requieren de péptidos y proteínas. Por lo tanto, las proteasas representan uno de los grupos enzimáticos más antiguos.

En los eucariotes superiores, la degradación de proteínas se lleva a cabo por complejos protéicos que contienen proteasas y proteínas reguladoras, los cuales les permiten distinguir a las proteínas que deben ser degradadas por medio de sistemas de identificación como la ubiquitinación.

En contraste con las proteasas presentes en el proteasoma, que llevan a cabo la degradación completa de una proteína, las caspasas hidrolizan enlaces peptídicos sólo en la vecindad de residuos o secuencias determinadas (Tabla I).

La participación de proteasas de la familia de las caspasas en la muerte celular programada apareció probablemente con los primeros organismos multicelulares complejos como sugiere el hecho de que CED-3/ICE/Caspasa-1 se encuentre presente en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*; cabe mencionar que el análisis genético de los genes que participan en el programa de muerte de *Caenorhabditis elegans* no ha demostrado la existencia de otra caspasa además de CED-3. La importancia de las proteasas en este proceso parece estar reflejada en el hecho de que en mamíferos se ha demostrado que más de 8 de estas enzimas participan en el proceso (las caspasas -2, -3, -4, -11, -6, -7, -8, -9 y -10). La diferencia entre una caspasa y ocho de ellas, entre nemátodos y mamíferos sugiere una diversificación de la función original dando lugar a un mayor grado de control de la apoptosis a distintos niveles.

PERSPECTIVAS

Existen dos tipos de problemas en las enfermedades asociadas a una alteración en la regulación de la muerte celular por apoptosis: aquellas que involucran una apoptosis excesiva causando daño a tejidos normales asociadas a enfermedades degenerativas, y aquellas en las que la apoptosis no se lleva a cabo, propiciando el crecimiento de un tejido maligno.

Para utilizar una terapia adecuada en enfermedades que se originan en la pérdida de la regulación de la apoptosis se necesita un mejor entendimiento del papel que juega cada una de las caspasas en la maquinaria apoptótica en diferentes tejidos. Para los casos de enfermedades degenerativas en las que se presenta apoptosis excesiva una

alternativa es la utilización de inhibidores de las caspasas. Estos inhibidores deben ser específicos, estables y permeables a la membrana celular. Esta estrategia podría evitar la muerte excesiva en tejidos normales.

Para procesos cancerosos que resultan de la interrupción de la muerte por apoptosis podría aplicarse una estrategia complementaria. Una alternativa, es la posibilidad de generar un tratamiento que active caspasas de forma directa. También podrían activarse a los receptores de muerte que promueven la activación de caspasas. El inconveniente a salvar consiste en evitar que otras células normales que también expresan los mismos receptores de muerte, respondan. Otra área de estudio se desprende de la observación de que oncoproteínas que alteran el control del ciclo celular como p53 puedan activar caspasas e inducir apoptosis.

En resumen, se han realizado progresos importantes sobre el entendimiento de las propiedades estructurales y catalíticas de las caspasas y su contribución a la apoptosis. La meta para futuras investigaciones consiste en entender la regulación de estas enzimas y de sus inhibidores, lo que podría facilitar la manipulación racional de la maquinaria apoptótica para aplicaciones terapéuticas en cáncer, lupus y enfermedades neurodegenerativas.

REFERENCIAS

1. Kerr JF, Wyllie AH y Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 238-257.
2. Yuang J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM y Horvitz (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β converting enzyme. *Cell* 75: 641-652.
3. Van de Craen M, Vandenabeele P y Declercq W (1997) Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Lett* 403: 61-69.
4. Cohen GM, (1997) Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16.
5. Kidd V, (1998) Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Ann Rev Physiol* 60: 533-573.
6. Gorman AM, Orrenius S, y Ceccatelli S (1998) Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuroreport* 9 (10): 49-55.
7. Zou H, henzel W y Liu X (1997) Apaf 1, a human protein homologous to *C. Elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase -3. *Cell* 90:405-413.
8. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR y Newmeyer DD (1997) The realease of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136.
9. Thornberry NA y Lazebnik Y (1998) Caspases: Enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
10. Green D, y Kroemer G (1998) The central executioners of apoptosis: Caspases or mitochondria ?, *Trends Cell Biol* 8: 267-271.
11. Tan X, y Wang j (1998) The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol* 8: 116-120.
12. Reed JC (1997) Cytochrome C: can't live with it - can't live without it. *Cell* 91: 559-562.
13. Pan G, O'Rourke K y Dixit VM, (1998) Caspase-9, Bcl-XL and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273(10): 5841-5845.
14. Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ (1998) Interaction of the Baculovirus anti.apoptotic protein p35 with caspases, specificity, kinetics, and characterization of the caspases/p35 complex. *Biochemistry* 37: 10757-10765.
15. Deveroux QL, Roy N, Stennicke HR (1998) IAPs block apoptosis events induced by caspase-8 and cytochrome C by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17 (8): 2215-2223.

TRANSPORTADORES DE CATIONES EN MITOCONDRIAS DE MAMÍFEROS

Ana Cecilia Zazueta Mendizábal. Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología, I. Chávez. México. 014080. D.F. Fax 5573-0926; Correo electrónico: zazueta22@hotmail.com

RESUMEN

La concentración mitocondrial de cationes controla un gran número de funciones metabólicas. Se ha demostrado que la concentración de calcio libre dentro de la mitocondria $[Ca^{2+}]_m$ modula la piruvato deshidrogenasa, así como el ciclo de los ácidos tricarbónicos en respuesta a demandas energéticas de los tejidos. Recientemente se ha descrito un nuevo sistema de transporte para calcio, que responde a pulsos de este catión provenientes del citosol y que regula pasos metabólicos dependientes de calcio dentro de la mitocondria.

El mantenimiento de la homeostasis mitocondrial y de otros cationes como el magnesio (Mg^{2+}), es muy importante ya que actúa como cofactor en un gran número de reacciones dentro de la matriz mitocondrial. El potasio (K^+) juega un papel crucial en el control del volumen mitocondrial. La concentración de sodio (Na^+) en el citosol (5-10 mM) es mucho menor que la de potasio, por lo que se ha sugerido que este ión se utiliza para controlar la concentración de otros iones como el calcio.

PALABRAS CLAVE: mitocondria, cationes inorgánicos, transportadores

ABSTRACT

Mitochondrial cation concentrations control a number of vital mitochondrial functions. It has been shown that the concentration of free calcium $[Ca^{2+}]_m$ regulates pyruvate dehydrogenase and the tricarboxylic acid cycle in response to increased tissue energy demands. Recently, a new mechanism for calcium uptake in response to physiological cytosolic Ca^{2+} pulses has been described, which results in the regulation of mitochondrial metabolism.

The maintenance of mitochondrial homeostasis of other cations such as Mg^{2+} is very important, as it functions as cofactor for a wide range of vital reactions in the mitochondrial matrix. K^+ plays an

important role in control of mitochondrial volume. Na^+ , whose concentration in the cytosol (around 5-10 mM) is much lower than that of K^+ , probably has a role in controlling the concentration of other ions, such as calcium.

KEY WORDS: mitochondria, inorganic cations, transporters

ACARREADORES Y CANALES

Los sistemas de transporte que permiten el paso de moléculas hidrosolubles a través de las membranas biológicas, son proteínas embebidas en la bicapa lipídica que la atraviesan totalmente, muestran especificidad por sus sustratos, siguen cinéticas tipo Michaelis-Menten y parecen existir en dos conformaciones alternativas.

La fuerza que impulsa el movimiento de cualquier especie iónica a través de una membrana biológica puede ser generada por: un gradiente de concentración, por un campo eléctrico o por el flujo de agua. Las fuerzas que frenan estos movimientos, resultan de la interacción con otros iones o moléculas que transitan a través de la membrana, o debido al acoplamiento químico con reacciones metabólicas (1).

Los mecanismos que han evolucionado para facilitar la difusión de moléculas hidrofílicas a través de las membranas son: la difusión simple, donde la vía de difusión es a través de la bicapa lipídica y la difusión facilitada, que involucra la combinación específica del soluto con un componente membranal (2). Al proceso de difusión que opera, llevando al soluto de un sitio de alto potencial electroquímico a uno de bajo potencial, se le conoce como transporte pasivo (difusión simple o facilitada). Por el contrario, muchos procesos de transporte se llevan a cabo en contra de un gradiente electroquímico y se conocen como mecanismos de transporte activo.

Entre los sistemas de difusión facilitada destacan las porinas, proteínas formadoras de poros de las membranas externas. En *E. coli* las porinas permiten el libre paso de moléculas de 700-900 Da y en mitocondrias de alrededor de 2000-6000 Da (2).

También se clasifica en esta categoría al acarreador de glucosa de los eritrocitos, que sin embargo no es estrictamente un "poro", sino un acarreador móvil, o poro con compuertas, ya que expone el sitio activo alternadamente a cada cara de la membrana (2).

Por su parte el transporte activo se clasifica en primario y secundario. El primario involucra la conversión de la energía lumínica o de la energía almacenada en enlaces químicos oxidables, hidrolizables o susceptibles de ser reducidos, en gradientes electroquímicos de protones o de otros cationes a través de la membrana. Los tres tipos más importantes de esta forma de transporte son:

a) La translocación de protones que resulta de la orientación asimétrica a cada lado de la membrana de los complejos que llevan a cabo reacciones de oxido-reducción sucesivas (complejos respiratorios).

b) Las ATPasas, enzimas unidas a la membrana que acoplan la hidrólisis de ATP a la translocación de iones, como por ejemplo la ATPasa de Na^+/K^+ , la ATPasa dependiente de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico y las P-, F- y V-ATPasas.

c) Las bombas iónicas impulsadas por luz de ciertas bacterias halofílicas (*Halobacterium halobium*).

El transporte activo secundario utiliza la energía almacenada en los gradientes iónicos generados por el transporte activo primario; de acuerdo a la dirección en que se mueven los solutos, estos mecanismos se han agrupado como:

1) Los simportadores (cotransportadores) acoplan el transporte de dos solutos a través de la membrana en la misma dirección. Por ejemplo, en la mitocondria el piruvato se cotransporta con un protón del citoplasma al interior de la matriz mitocondrial.

2) Los antiportadores (intercambiadores) acoplan el transporte de dos solutos a través de la membrana, pero en direcciones opuestas; en ocasiones al mecanismo se le llama "difusión de intercambio". Dos ejemplos de estos sistemas son el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$ y el translocador de ADP/ATP.

3) Los uniportadores transfieren un soluto a través de la membrana, que se mueve preferente en una dirección. Por ejemplo, el uniportador de Ca^{2+} o el uniportador de K^+ . En esta categoría se clasifican los canales, que forman poros hidrofílicos que atraviesan la membrana y que a diferencia de lo que ocurre con un acarreador, siempre son simultáneamente accesibles de cualquier lado de la membrana.

Los acarreadores pueden atravesar la bicapa, pero los sitios de unión del sustrato nunca son simultáneamente accesibles en ambos lados de la membrana. Debido a esta diferencia en su mecanismo de acción, los acarreadores, pero no los canales, pueden funcionar como intercambiadores (1).

Un acarreador requiere un entorno flexible para funcionar, mientras que un mecanismo mediado por un canal puede ser independiente de la fluidez de la membrana. Además, las velocidades de transporte de iones a través de los canales, son significativamente más altas que a través de un acarreador. Se han calculado velocidades de transporte de 10^6 iones/seg a partir de la medición de la conductancia de Na^+ en axón. Los valores reportados para el acarreador móvil de valinomicina son de 10^4 iones/seg; mientras que el número de recambio para algunos transportadores no llega a las 1000 moléculas/seg, por ejemplo, la bomba de Na^+/K^+ transporta 140 iones/seg (2). Las constantes cinéticas de algunos de los transportadores de cationes se muestran en la Tabla I.

Transporte de calcio

El uniportador de calcio mitocondrial es responsable de la rápida acumulación de este catión en la matriz, así como de otros cationes divalentes como el Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} y los lantánidos (por orden de selectividad) (3). El mecanismo de salida de $[\text{Ca}^{2+}]$ presente en las mitocondrias de corazón y de cerebro, que requieren una rápida respuesta

TABLA I

PARÁMETROS CINÉTICOS DE ALGUNOS TRANSPORTADORES CATIONICOS DE MITOCONDRIAS					
	TEJIDO	MÉTODO	pHo (mM)	Km nmol/mg/min	Vmax
Uniportador de Ca²⁺	Hígado	Acumulación de Ca ²⁺ (indicador metalocrómico) ^a	7.2	0.013-0.016	600-900
Intercambiador Ca²⁺/H⁺	Hígado	Liberación de Ca ⁺ en presencia de rojo de rutenio ^b	7.2	8.4±0.6	1.2±0.1
Intercambiador Ca²⁺/Na⁺	Hígado	Salida de Ca ²⁺ inducida por Na ⁺ (indicador metalocrómico) ^c	7.2	K _{Na} 9.4 K _{Ca} 8.1	2.6±0.5
Intercambiador Na⁺/H⁺	Corazón de rata	Salida de H ⁺ inducida por Na ⁺ (electrodo de pH) ^d	6.9	30	400

Los datos de esta tabla fueron tomados de: a) Gunter, K. Y Gunter, T. JBB (1994)26,471-485. b) Wingrove, D. y Gunter, T. JBC(1986)261:15159-65; c) Wingrove, D. y Gunter, T. JBC(1986)261:15166-71; d) Kapus, A et al., BBA (1988)994, 383-390.

metabólica, es a través de un antiportador Ca²⁺/2Na⁺; en otros tejidos como hígado y riñón, el mecanismo de salida más importante se lleva a cabo a través de un antiportador Na⁺/H⁺. Estos transportadores funcionan concertadamente para controlar la concentración de Ca²⁺ en la matriz (Figura 1).

Bajo condiciones fisiológicas basales la [Ca²⁺]_C (citósólica) es baja, alrededor de 100 nM; después de una estimulación hormonal, se han observado aumentos transitorios de la [Ca²⁺]_C y hasta secuencias de estos aumentos pulsátiles (4) cuyas características varían, dependiendo del tipo de célula y del agonista; en estas condiciones se han medido pulsos que alcanzan concentraciones de 1-2 mM con segundos y hasta minutos de duración. Sparagna y colaboradores (5) observaron un incremento en el Ca²⁺ total después de exponer a la mitocondria a pulsos de Ca²⁺, similares a los observados en el citosol de hepatocitos después de una estimulación hormonal. Estos autores señalan que existe una entrada de Ca²⁺ muy rápida en mitocondrias, aún a concentraciones muy bajas y sugieren que esta entrada representa uno de los dos estados de conductividad que puede adoptar el uniportador de Ca²⁺. El segundo estado de conductividad sería el transporte lento de grandes can-

tidades de Ca²⁺, en condiciones patológicas y de sobrecarga de Ca²⁺.

Otra interpretación es la existencia de microambientes citosólicos, con [Ca²⁺]_C de hasta 10mM, en donde las mitocondrias se encuentran íntimamente asociadas con los canales de Ca²⁺ de retículo endoplásmico y de membrana plasmática; en esta localización las mitocondrias serían capaces de captar grandes cantidades de Ca²⁺, cada vez que este ion es liberado del retículo en respuesta a una estimulación hormonal (6).

La técnica más reciente y novedosa para medir la [Ca²⁺]_m en células intactas, es la utilización de la proteína recombinante aquarina. Rizzuto y colaboradores (7) determinaron que en reposo la [Ca²⁺]_m es baja (<0.2 μM), pero tras la estimulación hormonal este valor se incrementa a unidades de orden micromolar (1-3 μM). Estos valores exceden los reportados por Hansford y colaboradores en 1991, quienes por primera vez midieron la [Ca²⁺]_m en miocitos cardiacos de rata, utilizando el indicador fluorescente indo-1, que se acumula tanto en las mitocondrias como en el citosol. Estos autores encontraron que en células no estimuladas la [Ca²⁺]_m es alrededor de 100 nM y en pre-

sencia de norepinefrina se eleva hasta 600 nM. El propio Hansford comenta las limitaciones de la técnica con el indicador fluorescente indo-1 (8), ya que se requiere apagar la fluorescencia citosóli-

ca exponiendo las células a Mn^{2+} . Desafortunadamente, el Mn^{2+} también podría unirse al uniportador de Ca^{2+} o a los intercambiadores de Ca^{2+} , modificando la cinética del transporte de Ca^{2+} mitocondrial.

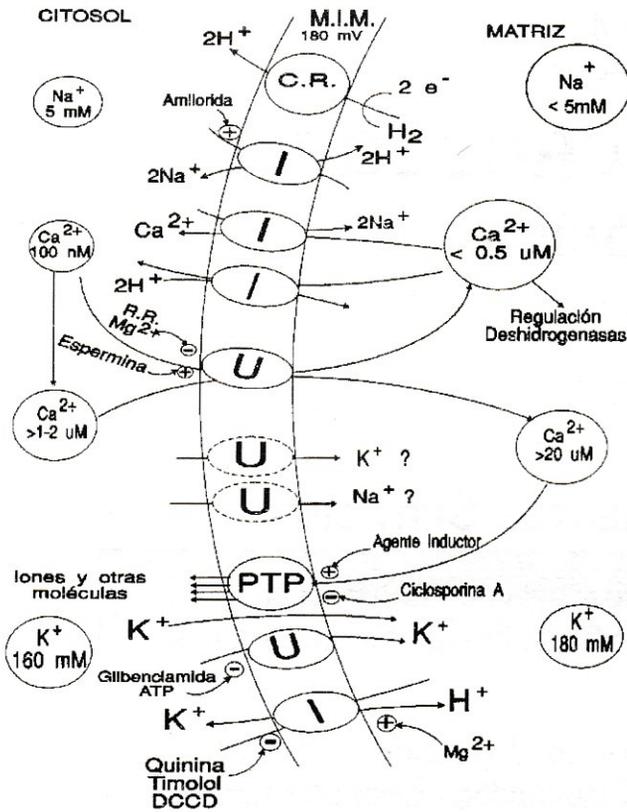


Figura 1. Transporte mitocondrial de cationes por uniportadores (U) o por intercambiadores (I). El Na^+ se expulsa de la mitocondria en intercambio con H^+ a través del intercambiador electroneutral Na^+/H^+ . El gradiente de Na^+ resultante se utiliza para extraer al Ca^{2+} de la mitocondria mediante el intercambiador $Ca^{2+}/2Na^+$. El uniportador de Ca^{2+} , facilita la entrada de Ca^{2+} a favor de su gradiente electroquímico, en respuesta a un potencial de membrana interno negativo mitocondrial, mantenido por la cadena respiratoria (C.R.). El Ca^{2+} interno también puede ser expulsado a través de un intercambiador $Ca^{2+}/2H^+$. A altas concentraciones de Ca^{2+} , se activa un mecanismo de permeabilidad inespecifica denominado poro de la transición de la permeabilidad (PTP), que permite el libre paso de pequeños iones y moléculas mayores, a través de la membrana interna mitocondrial y que se inhibe por el inmunosupresor ciclosporina A. El K^+ entra a la mitocondria, por medio de un uniportador sensible a ATP y glibenclámina, o por difusión directa a través de la membrana. El K^+ interno se libera en intercambio por H^+ . Este intercambio es regulado por el Mg^{2+} de la matriz. Los uniportadores de K^+ y Na^+ , sensibles a rojo de rutenio, se activan al eliminar el Mg^{2+} del citosol. Su función, así como los mecanismos que regulan su actividad, no se han aclarado aún.

Un evento clave tras el incremento en la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, es la estimulación del metabolismo a través de las deshidrogenasas de la matriz, evento que aparentemente está sujeto a control hormonal (8). Se ha sugerido un esquema general que integra el metabolismo mitocondrial con la generación de señales que se manifiestan como cambios en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma ($[Ca^{2+}]_c$). La estimulación hormonal libera Ca^{2+} de los almacenes celulares a través de los canales sensibles a inositol fosfato (IP_3) y dispara los procesos de proliferación celular, movilidad, secreción, etc. En una gran variedad de tipos celulares, se han observado valores muy altos de $[Ca^{2+}]_m$, que se piensa estimularían la actividad metabólica de acuerdo a la demanda energética de la célula (9).

Existe un cuarto mecanismo de transporte de Ca^{2+} denominado transición de la permeabilidad mitocondrial. Este fenómeno se caracteriza por un incremento en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, que lleva a la despolarización de la membrana y al equilibrio de especies moleculares de hasta 1600 Da dentro y fuera de la mitocondria (algunos autores proponen que pueden salir proteínas de mayor peso molecular, como por ejemplo, citocromo c). Este poro posee muy baja selectividad, permitiendo el paso de H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , glutamato e incluso sacarosa. Se sabe que la transición de la permeabilidad opera a través de un poro, regulado por diferentes compuestos entre los que se encuentran el Ca^{2+} , los radicales libres, la ceramida y moléculas pro-apoptóticas como Bax y las caspasas. La mayoría de los modelos sugieren que el translocador de nucleótidos de adenina es la entidad que estructuralmente forma el poro, o por lo menos juega un papel muy importante en su regulación. Se ha sugerido que el poro mitocondrial puede participar en el sistema de señales intracelular y en la liberación de proteínas involucradas en los procesos de muerte celular por apoptosis (10). Sin embargo, su papel fisiológico *in vivo* es materia de un intenso debate.

Transporte de potasio

En los mamíferos las mitocondrias están expuestas a altas concentraciones citosólicas de K^+ (160 mM) y en comparación a bajas concentraciones de Na^+ (5 mM). Sin embargo, la concentración mitocondrial de potasio $[K^+]_m$, es casi igual a la $[K^+]_c$ (citoplásmica), gracias a una baja permeabilidad electroforética (excepto cuando el potencial de membrana es muy alto) y por la presencia de un antiportador K^+/H^+ , identificado como una proteína de la membrana interna mitocondrial de 82 kDa que elimina el exceso de potasio (11) (Fig 1). Este antiportador se encuentra en estado latente y su actividad se desenmascara por hinchamiento osmótico o por la eliminación del Mg^{2+} mitocondrial (12); puede transportar Li^+ , Na^+ , Rb^+ o Cs^+ en intercambio por un H^+ y es sensible a quinina, timolol y otras aminas. El antiportador K^+/H^+ se inhibe por DCCD cuando las mitocondrias se incuban en un medio hipotónico libre de Mg^{2+} . Como se verá más adelante, la salida de Mg^{2+} puede llevarse a cabo a través de este antiportador.

Recientemente se ha demostrado la existencia de un uniportador de K^+ , sensible a glibenclamida y a ATP, conocido como el canal de K -dependiente de ATP (K_{ATP}) (14). El canal K_{ATP} en mitocondrias está regulado por todos los ligandos que modulan a los canales K_{ATP} de membrana plasmática (12), lo que sugiere que pertenecen a la misma familia de genes. El descubrimiento del canal K_{ATP} en mitocondrias trae consigo importantes implicaciones del papel fisiológico del ciclo del K^+ , ya que la existencia de dos vías reguladas para la entrada y salida de este ión significa que pueden contribuir a la regulación del volumen mitocondrial *in vivo*. Al respecto se ha sugerido que el volumen de la matriz regula el transporte de electrones en mitocondrias de hígado y corazón (15).

Transporte de sodio

La concentración de Na^+ en el citosol y en la matriz es prácticamente la misma (5mM). Las mitocondrias son permeables al Na^+ como resultado de la presencia de un antiportador Na^+/H^+ que mantiene el gradiente electroquímico de Na^+ igual al gradiente de H^+ . A su vez el gradiente de Na^+ permite la salida de Ca^{2+} a través del antiportador $Ca^{2+}/2Na^+$ (Fig 1). Como ya se explicó, el balance cinético entre este transportador $Ca^{2+}/2Na^+$ y el

uniportador de Ca^{2+} , mantiene la concentración de Ca^{2+} en la matriz y le permite funcionar como regulador metabólico al controlar la oxidación de sustratos.

El antiportador Na^+/H^+ mitocondrial comparte muchas propiedades con el antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática. La K_m para Na^+ es similar en los dos sistemas y ambos tienen un sitio de unión externo para Na^+ , Li^+ o H^+ . Aunque también muestran claras diferencias: el antiportador de membrana plasmática, pero no el mitocondrial, transporta iones NH_4^+ ; además la sensibilidad a los análogos de amilorida es diferente (16), por lo que se ha sugerido que ambos antiportadores representan entidades moleculares diferentes.

Al disminuir la concentración de Mg^{2+} mitocondrial se activa el transporte de cationes monovalentes a través de uniportadores latentes; por ejemplo, uniportadores de Na^+ o de K^+ . Se ha demostrado la sensibilidad de estos uniportadores a glibenclamida (12), que es un potente bloqueador de los canales de K^+ regulados por ATP en la membrana plasmática.

El hallazgo de que bajas concentraciones de rojo de rutenio: $[(NH_3)_5-Ru^{III}-O-(NH_3)_4-Ru^{IV}-O-Ru^{III}(NH_3)_5]^{+6}$ bloquean a los uniportadores de Na^+ y de K^+ , sugiere que la sensibilidad a este inhibidor podría reflejar una semejanza estructural entre los diferentes uniportadores (sitios de unión comunes para el rojo de rutenio), situación que podría considerarse análoga a la observada en algunos acarreadores de sustratos aniónicos (17). Esta observación sugiere la existencia de una vía específica a través de un uniportador para la entrada de estos cationes. Otra posibilidad es que las condiciones bajo las cuales se puede "desenmascarar" la actividad de estos transportadores, modifiquen la actividad de transportadores que tienen otras funciones en mitocondrias intactas (16).

Transporte de magnesio

Las vías de entrada y salida de Mg^{2+} en las mitocondrias no se han definido concluyentemente a la fecha. Las mitocondrias de corazón acumulan grandes cantidades de Mg^{2+} , cuando se incuban en un medio no iónico, con altas concentraciones de Mg^{2+} y en presencia de fosfato. Se ha sugerido que

la acumulación de Mg^{2+} ocurre a través de vías de difusión inespecíficas, dependientes del potencial de membrana. El Mg^{2+} se uniría a diferentes sitios en la superficie de la membrana, colocándose en una posición favorable para entrar rápidamente a la mitocondria, en respuesta a un aumento en el potencial, acompañado por fosfato (18).

La entrada de Mg^{2+} es activada por Zn^{2+} , Cd^{2+} o mercuriales, que se sabe incrementan la permeabilidad inespecífica de la membrana. Brierley y colaboradores en 1997, observaron que la unión de Mg^{2+} , así como la entrada del catión inducida por nigericina, se inhibían por cationes monovalentes (18). Por otro lado, la liberación de Mg^{2+} se asemeja a la de K^+ y podría ocurrir en intercambio con H^+ (13).

Existen reportes que indican que los movimientos de Mg^{2+} pueden estar relacionados con el ciclo de Ca^{2+} ; Gunter y Pfeiffer (3) explican que las mitocondrias que han entrado al proceso de transición de la permeabilidad mitocondrial y que pierden entre otras cosas Mg^{2+} , pueden reacumular Ca^{2+} . Sin embargo, el transporte de Mg^{2+} , que es mucho más lento, no podrá compensar el ciclo de entrada-salida de Ca^{2+} , con lo que la pérdida total de Mg^{2+} se producirá rápidamente. Discuten además que la operación del poro de la transición de la permeabilidad membranal, podría ocurrir *in vivo* y este mecanismo sería la manera en que la mitocondria podría controlar los flujos de Mg^{2+} y de K^+ entre la matriz y el citosol.

Además del papel como cofactor que el Mg^{2+} juega en diferentes reacciones mitocondriales, por ejemplo, en la síntesis del ATP, como activador de los complejos de la piruvato y la 2-oxoglutarato deshidrogenasas, como cofactor de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , etc; existe una propuesta muy interesante del papel regulador del Mg^{2+} sobre el movimiento de iones en la mitocondria, que es la hipótesis del freno al antiportador K^+/H^+ (15). Este antiportador parece controlar la homeostasis del volumen mitocondrial y responde a cambios en la concentración de Mg^{2+} . Se ha propuesto que bajo condiciones en que el volumen de la matriz aumenta, la concentración del Mg^{2+} disminuye, desocupando los sitios de regulación negativa del transportador, de manera

que la salida de iones aumentaría y produciría la contracción osmótica. Al disminuir el volumen, la concentración de Mg^{2+} aumentaría y se restablecería el equilibrio entre los sitios de regulación con lo que se inhibiría la expulsión de iones.

CONCLUSIONES

El transporte de cationes monovalentes en las mitocondrias de los mamíferos se lleva a cabo a través de tres intercambiadores y por lo menos un uniportador: 1) Un intercambiador K^+/H^+ regulado alostéricamente, que aparentemente sirve como un dispositivo de expulsión de K^+ para mantener la homeostasis del volumen mitocondrial. 2) Un intercambiador Na^+/H^+ que mantiene la concentración de Na^+ y el gradiente de Na^+ igual al de H^+ . 3) Un antiportador $Ca^{2+}/2Na^+$ que permite la salida de Ca^{2+} , con lo que la mitocondria puede regular la $[Ca^{2+}]_m$, al equilibrar la salida de Ca^{2+} con la entrada de este ión a través del uniportador de Ca^{2+} . La mitocondria también contiene uniportadores para cationes monovalentes, como el canal de K^+ sensible a glibenclamida y a ATP; además de los que parecen ser uniportadores para Na^+ y K^+ , sensibles a rojo de rutenio. La razón para la existencia de tales uniportadores es difícil de comprender. Se ha propuesto que sólo se abren cuando el potencial de membrana es elevado. La apertura de tales vías sería fatal para la mitocondria, por lo que debemos suponer que estos uniportadores deben mantenerse cerrados hasta que no prevalezca alguna condición poco usual. Ya que no se han definido los mecanismos que regulan a estos transportadores, su papel fisiológico aún no es muy claro.

En el caso de los transportadores de Ca^{2+} , la mitocondria parece responder a cambios en la concentración de este catión bajo condiciones fisiológicas. A medida que se avance en el desarrollo de técnicas electrofisiológicas y de reconstitución de estos transportadores, entenderemos del todo sus funciones fisiológicas.

REFERENCIAS

1. Wolfersberger M (1994) Uniporters, Symporters and Antiporters. *J Exp Biol* 196: 5-7.
2. Stein W (1986) Transport and diffusion across cell membranes. Capítulo 4, Academic Press, Orlando, Florida.

3. Gunter T y Pfeiffer D (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258: C755-C786.
4. Gunter T, Buntinas L, Sparagna G y Gunter K (1998) The Ca^{2+} transport mechanisms of mitochondria and Ca^{2+} uptake from physiological-type Ca^{2+} transients. *Biochim Biophys Acta* 1366: 5-15.
5. Sparagna G, Gunter K y Gunter T (1994) A system for producing and monitoring in vitro calcium pulses similar to those observed in vivo. *Anal Biochem* 219: 96-103.
6. Ichas F y Mazat J (1998) From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low-to high conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1366: 35-50.
7. Brini M, Marsault R, Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T y Rizzuto R. (1995) Transfected aquorin in the measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). A critical evaluation. *J Biol Chem* 270: 9896-9903.
8. Hansford R y Zorov D. (1998) Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Moll and Cell Biochem* 184: 359-369.
9. Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, Murgia M y Pozzan T. (1994) Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells. *J Cell Biol* 126: 1183-1194.
10. Bernardi P, Basso E, Colonna R, Constantini P, Di Lisa F, Eriksson O, Fontaine E, Forte M, Ichas F, Massari S, Nicolli A, Petronilli V y Scorrano L (1998) Perspectives on the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1365: 200-206.
11. Martin W, Beavis A y Garlid K (1984) Identification of an 82,000 dalton protein responsible for K^+/H^+ antiport in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 259 (4): 2062-2065.
12. Szewczyk A, Pikula S, Wójcik G y Nalecz M (1996) Glibenclamide inhibits mitochondrial K^+ and Na^+ uniports induced by magnesium depletion. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 863-871.
13. Diwan J, Paliwal R, Kaftan E. y Bawa R (1990) A mitochondrial protein fraction catalyzing transport of the K^+ analog Tl^+ . *FEBS Lett* 273: 215-218.
14. Inoue I, Nagase H, Kishi K y Higuti T (1991) ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352: 244-247.
15. Garlid K (1996) Cation transport in mitochondria. The potassium cycle. *Biochim Biophys Acta* 1275: 123-126.
16. Kapus A, Lukács G, Cragoe E, Ligeti E y Fonyó A (1988) Characterization of the mitochondrial Na^+/H^+ exchange. The effect of amiloride analogues. *Biochim Biophys Acta* 944:383-390.
17. Kapus A, Szaski K, Kaldi K, Ligeti E, y Fonyo A. (1990) Ruthenium red inhibits mitochondrial Na^+ and K^+ uniports induced by magnesium removal. *J Biol Chem* 265: 18063-18066.
18. Jung D, Panzeter E, Baysal K y Brierley G (1997) On the relationship between matrix free Mg^{2+} concentration and total Mg^{2+} in heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1320: 310-320.

LA CIENCIA A LA ZAGA DE LA NATURALEZA

Jorge Joel Reyes Méndez. Departamento de Atención a la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, DF, CP 04960; Correo electrónico: joelr@cueyatl.uam.mx

RESUMEN

Una tendencia entre los biólogos ha sido tratar de reducir la biología a la física y a la química; al mismo tiempo, algunos químicos tratan de seguir en sus matraces los caminos que la naturaleza ha seguido en su evolución. ¿Qué implicaciones tiene esto para la ciencia actual?

El premio Nobel en química 1987, fue otorgado a Donald Cram, de la Universidad de California en Los Ángeles, Jean-Marie Lehn de la Universidad Luis Pasteur en Estrasburgo, Francia y a Charles Pedersen de la Compañía Du Pont de Nemours & Co. por sus trabajos sobre el reconocimiento molecular fundamental en las reacciones enzimáticas. Mimetizar los trucos de la naturaleza ha sido una antigua meta de la química orgánica. “*Con su trabajo Cram, Lehn y Pedersen han mostrado el camino*”, apunta la Real Academia Sueca en su carta Nobel.

PALABRAS CLAVE: Criptanos, éteres corona, química supramolecular, especificidad, moléculas cóncavas

ABSTRACT

Some biologists have been promoting a reduction of biology to physics or chemistry; while some chemists are trying to elucidate from their experiments the road that nature has followed along millenniums of evolution. What implications does this have for current science?

The Royal Swedish Academy of Sciences decided to award the 1987 Nobel Prize in chemistry jointly to Professor Donald J. Cram, University of California, Los Angeles, Professor Jean-Marie Lehn, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France, and Charles J. Pedersen, Du Pont, Nemours & Co., for their development and use of molecules with structure-specific interactions of high selectivity. Molecules have been produced that mimic the mode of action of enzymes. Chemists have long dreamed of

synthesizing relatively uncomplicated organic compounds that perform the same functions as natural proteins, mimicking the tricks of nature. The Royal Academy, in the Nobel communication wrote, “*Through their work, Cram, Lehn and Pedersen have shown the way.*”

KEY WORDS: Cryptands, crown ethers, supramolecular chemistry, specificity, concave molecules.

PRIMER PASO: LOS CRIPTANOS

Charles J. Pedersen, de la compañía Du Pont, inició los trabajos que condujeron al descubrimiento de lo que hoy conocemos como criptanos, en 1967 con la síntesis de grandes compuestos cíclicos, formados por cadenas de carbono, que a intervalos regulares tenían un átomo de oxígeno por lo que los llamó “éteres corona” (1). Estas moléculas con especial afinidad por iones de metales alcalinos a los que albergaban en su centro, eran en ausencia de éstos, fofas y flácidas; sólo la introducción del ion metálico les daba forma y hacía a la molécula asumir una estructura más organizada similar a un plato (2).

Poco tiempo después Lehn estudió el mismo sistema, observando a las moléculas desde tres dimensiones, agregando más capas, lo que las hacía similares a platos apilados. De esta manera logró compuestos policíclicos a los que llamó **criptanos** por contener un orificio central o cripta (3).

Los estudios cristalográficos permitieron apreciar que la unión del criptano con su substrato, producía siempre modificaciones altamente transitorias en ambas moléculas, debido a que retornaban a su estado normal en fracción de segundos al dejar de interactuar. Cuando los complejos de Lehn aceptaban una molécula central, ésta era acoplada de manera muy específica, de forma tal que pareciera que se acomodaban. A diferencia de la mayoría de las reacciones en la química orgánica, no se formaban uniones covalentes, sino débiles

interacciones electrostáticas, lo cual explica la transitoriedad de las reacciones criptano-substrato. Lehn llamó a esta fenomenología **Química supramolecular**, convencido de que en la química de este tipo de macromoléculas, se presentan situaciones y problemas diferentes que los acaecidos entre moléculas pequeñas (4) (Fig 1).

Cram, que seguía la misma línea de trabajo, utilizando grandes cantidades de modelos moleculares de plástico, ya que en su labor resultaba esencial la visión de la forma, la estructura y la flexibilidad de las moléculas, decía: "sólo puedo sintetizar lo que he podido visualizar", logró crear compuestos policíclicos capaces de permanecer rígidos, ya fuera que estuvieran o no unidos a un sustrato. Nombró a sus moléculas cavitantes; éstas tenían las mismas características de los criptanos de Lehn, sólo que eran más estables. Cram llamó a su sistema químico del huésped-parásito, equiparando la molécula receptora a un huésped y la molécula central al parásito (5).

LA QUÍMICA IMITANDO A LA NATURALEZA

Cram es un experto en modelaje molecular, y a la fecha él y sus colaboradores han podido seguir el proceso por estudios de cristalización, en cientos de sus parejas huésped-parásito moleculares y han observado la conformación inicialmente observada por Lehn, de modificaciones transitorias, la cual ha coincidido en la mayor parte de los casos con las predicciones efectuadas en modelos previos al trabajo experimental.

Cuando estos químicos iniciaron sus investigaciones sobre el uso potencial de los criptanos como enzimas artificiales, se percataron de que tenían que lograr moléculas cóncavas que pudieran poseer sitios activos hidrófobos. Con sorpresa encontraron que la inmensa mayoría de las moléculas en la química orgánica eran convexas, por la irradiación hacia afuera de los átomos de las uniones covalentes. Sólo encontraron una docena de moléculas cóncavas entre siete millones de sustancias orgánicas producidas por síntesis.

Además pudieron apreciar que para la producción de este tipo de moléculas, la naturaleza había requerido de complejos muy grandes, de por lo menos 20,000 daltones. Esta parecía ser la única forma de poder producir moléculas cóncavas, con criptanos en el centro, capaces de permitir reacciones químicas de una especificidad tal que las hiciera capaces de modificar en una forma muy precisa a los sustratos y de llevarse a cabo en tiempos muy breves; de esta manera, la naturaleza puede realizar el gran número de reacciones necesarias para lograr mantener a un organismo. Ellos lograron producir moléculas que constituyen excelentes modelos de falsas enzimas con pesos moleculares de sólo el 10% de los usados en la naturaleza (6) (Fig 2).

Si bien el campo de la química del reconocimiento molecular tardó treinta años en ser apreciada, ahora se encuentra en franco desarrollo y augura una nueva revolución en la química. A la fecha se han sintetizado parejas de moléculas de

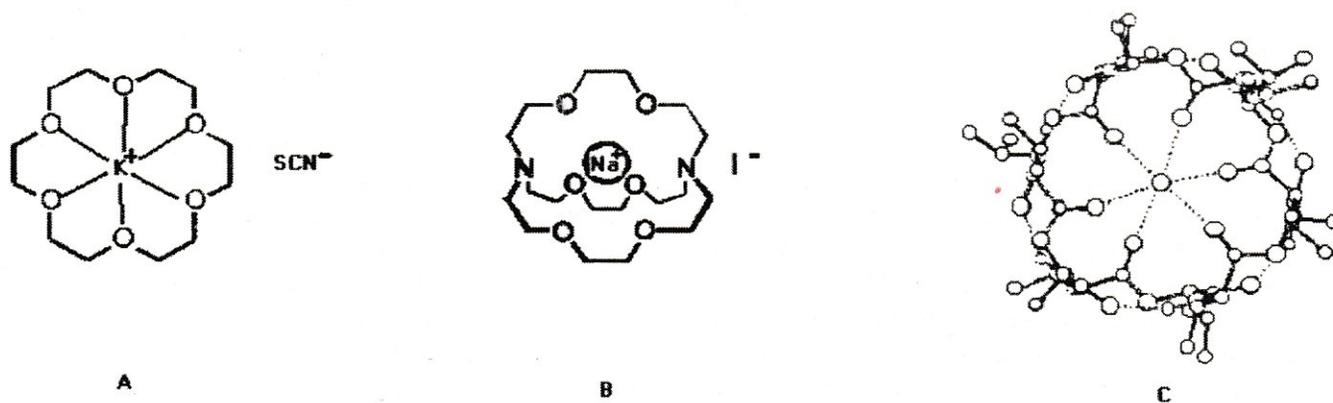


Figura 1. Diferentes modelos propuestos para los criptanos. En **A** se representa un complejo eter-corona de acuerdo a Pedersen (1); **B** un complejo criptando=criptano, según Lehn (3) y en **C** un complejo huésped-parásito, según Cram (5).

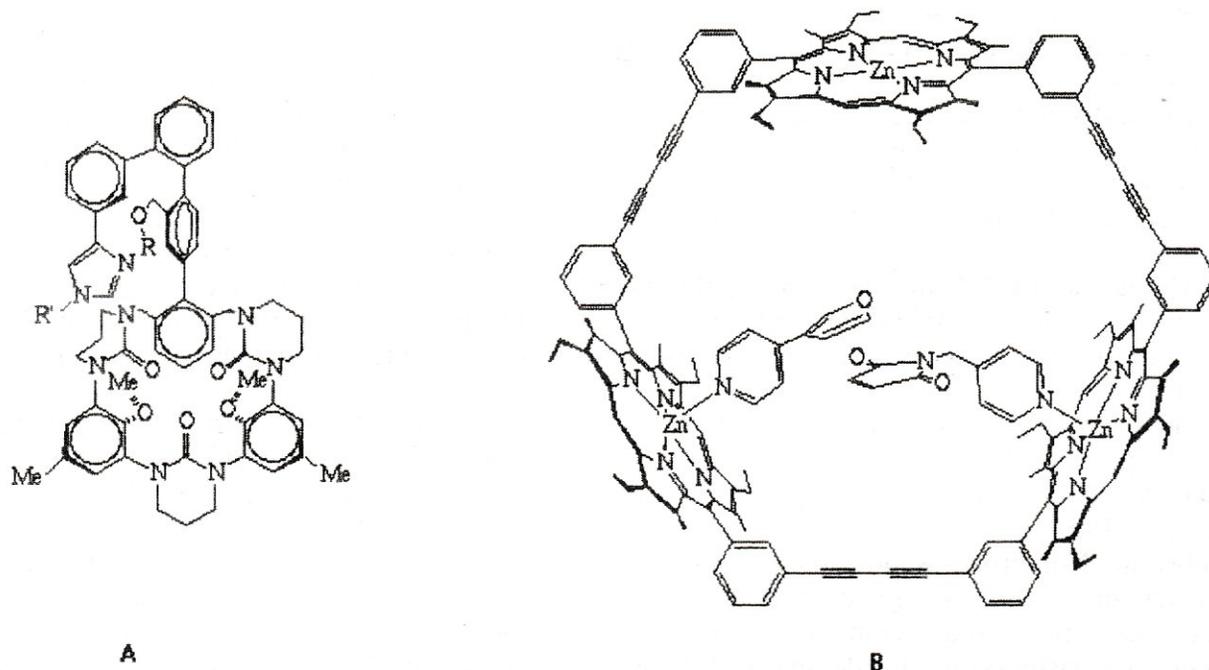


Figura 2. La molécula que se representa en **A** mimetiza parcialmente a la enzima transacilasa, de acuerdo a Cram (5). En **B** se presenta un supercomplejo obtenido por Lehn (3).

este tipo, como el *Cesium 18-Crown-6* (Cesio 18-Corona-6 por la posición del átomo de cesio con respecto a la corona formada por los carbonos) propiedad de Du Pont, que unidas por la mitad, forman verdaderas celdas químicas que permiten que una reacción química se realice en su interior, aún en solución, sin dejar escapar el sustrato. Moléculas que constituyen verdaderos laboratorios en miniatura, de los que se esperan aplicaciones insospechadas tanto en la terapéutica médica, en la que permitirán la administración de dosis continuas de medicamentos con una sola introducción al cuerpo, hasta en la síntesis orgánica, en la que este tipo de moléculas podrá permitir que una sola reacción se efectúe inmersa en una solución heterogénea (7).

Uno de los tempranos frutos de esta nueva rama de la química fue la síntesis de nuevos materiales cristalinos, los *electrides* logrados por James Dye de la Universidad de Michigan (8). Dye utilizó parejas de éteres corona con los que encerró en sus cavidades electrones que funcionan como aniones, y así logró la construcción de materiales cristalinos en los que los aniones son electrones aislados e incommunicados dentro de un criptano. Aislados en el interior de las moléculas

del criptano *Cesium 18-Crown-6*, los electrones son capaces de formar uniones iónicas cuyo producto cristalino son estos *electrides* que constituyen las primeras sales iónicas en las que todos los sitios aniónicos se encuentran ocupados solamente por electrones. Los electrones, a diferencia de los aniones normales, no se comportan como si fueran esferas cargadas negativamente, especialmente por su casi falta de masa, lo que da a estos nuevos materiales insospechadas propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas (9).

Las propiedades de estos cristales dependen de las distancias entre las cavidades, que mantienen atrapados a los electrones y de la naturaleza de los túneles que conectan las cavidades. Así cuando los electrones atrapados se encuentran muy alejados, no interactúan fuertemente y sólo se comportan como un arreglo periódico de cargas negativas aisladas. Mientras que al disminuir las distancias entre ellos, empiezan a mostrar las propiedades que predice la mecánica cuántica. Si aún se acercan más, se deslocalizan y dejan de permanecer en sus cavidades aisladas, siendo capaces de pasar a través de la red de los iones positivos y aún de generar corrientes de electrones con efecto túnel (10). Por esta razón estos cristales sin

aniones, de los que aún no se pueden predecir los usos, ni sus futuras aplicaciones, además de que darán a la humanidad una gran multitud de materiales con propiedades insospechadas, constituyen una fascinante oportunidad para estudiar el comportamiento de los electrones y su interrelación con los sólidos.

Con los inicios de esta química que trata de imitarla, se adquirió una deuda con la naturaleza, ya que se han descubierto comportamientos insospechados de los electrones. Tal vez estemos en el umbral de descubrimientos que hace unos cuantos años hubieran parecido de ciencia ficción. Es posible que esta deuda tenga como pago en un futuro el descubrimiento de que estos nuevos mecanismos ya habían sido utilizados en la evolución, sólo que no podíamos encontrarlos por no pensar en ellos. Se encontraban no sólo cerca de nosotros, sino más bien formando parte de nosotros mismos. Es el caso del mecanismo mediante el cual se orientan los murciélagos. Hasta que se descubrió el radar y nació la ciencia biónica, se conectaron ambos hechos y se demostró que muchos millones de años antes de que Maxwell predijera su existencia y Hertz lo descubriera, ya la naturaleza lo había usado (11).

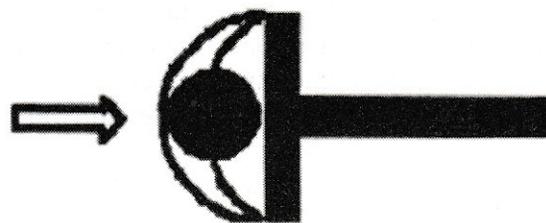
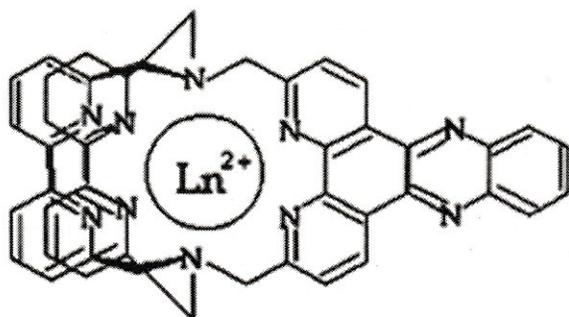
CONCLUSIÓN. EL FUTURO YA ESTÁ AQUÍ

De ser cierta esta predicción, tal vez debamos prepararnos a aceptar en un futuro, fenómenos como la superconducción en los cristales líquidos de nuestras proteínas, el paso de corrientes de electrones con efecto túnel que expliquen la función de algunas enzimas y tal vez la presencia de co-

nexiones de tipo Josephson en nuestras neuronas. Este tipo de conexión constituye el interruptor de las computadoras superconductoras del futuro (12).

Lehn recientemente ha desarrollado una nueva metodología sintética para la preparación de criptanos lantánido-luminiscentes de los cuales se espera que participen en el enlace no-covalente de la doble hélice de ADN mediante intercalación. Esta forma no-covalente de enlace, es de gran interés, debido al uso potencial del ADN como blanco para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, desórdenes genéticos y para el tratamiento de algunos cánceres. En su trabajo de química supramolecular, han diseñado una nueva clase de criptanos con propiedades intercaladoras, formados por la inclusión de un ion lantánido-luminiscente dentro de la cavidad de un ligando macropolícíclico (13). Estos compuestos han mostrado características notables, como largos tiempos de fluorescencia y emisiones de banda lineales, resistencia a las interacciones del microambiente, aunados a una gran sensibilidad. El criptano ha sido diseñado para unirse al ADN mediante intercalación del complejo del anillo fenolizado entre los pares de base del ADN (14) (Figs 3 y 4).

En la figura 5 se puede apreciar las dos formas de crear peptidasas artificiales. El mecanismo de reacción de la parte superior izquierda indica el modo de reacción de la enzima natural: el átomo de azufre de una cisteína de la enzima ataca el átomo de carbono del enlace peptídico de una proteína. En la parte inferior se representa la enzima ar-



**Representación
esquemática del
Criptano**

Figura 3. Criptano lantánido (1, Ln=Tb³⁺ o Eu³⁺) actualmente en investigación.

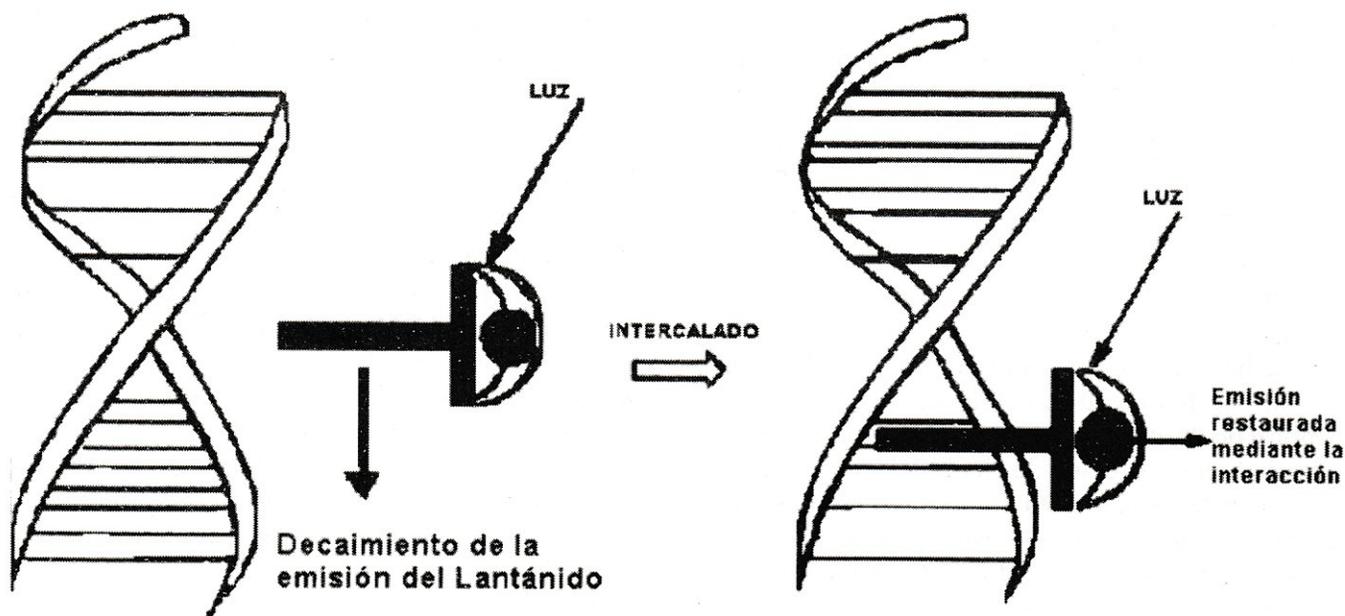


Figura 4. Esquema que muestra la interacción entre una cadena de ADN y el criptano lantánido. Izquierda) sin intercalación se aprecia un proceso fugaz no-radiactivo supresor de la emisión del lantánido. Derecha) La emisión del lantánido es restaurada mediante la interacción.

tificial cuyo átomo de azufre (en gris) ataca el carbono de un enlace éster de un compuesto modelo (3). El enlace éster pertenece a una familia de enlaces parecidos al enlace peptídico; pero se corta más fácilmente y por esta razón ha sido elegido como modelo.

El enfoque del equipo de Cram es totalmente distinto (esquema B). El mecanismo de la reacción de la parte superior derecha representa la acción de la serina peptidasa, sobre el enlace peptídico (5).

Desde hace unos años Cram trata de reproducir en su enzima artificial la parte correspondiente a la zona activa de la enzima natural, la serina peptidasa (arriba en B). El sustrato que contiene el enlace peptídico a cortar pasaría a alojarse dentro de la cavidad del receptor (en gris). Pero la síntesis de un receptor tan complejo como éste dura varios años. Hasta ahora sólo han podido sintetizarse los precursores de esta enzima artificial (6).

Esta nueva revolución en la química, lograda al inicio apenas del entendimiento del camino que tomó la naturaleza en la parte química de su evolución, promete al hombre tecnologías insospechadas, ya que la introducción de enzimas artificiales,

capaces de ser controladas por moléculas inocuas a voluntad, hará posible en el futuro el injerto químico y otorgarle a un organismo los mecanismos moleculares precisos que éste pudiera requerir (15). Todo esto me permite afirmar que nuestros nietos se reirán de las jeringuillas hipodérmicas, así como nosotros lo hacemos de las sangrías hechas con sanguijuelas utilizadas por los médicos en el pasado.

REFERENCIAS

1. Pedersen CJ (1967) Macrocyclic polyethers for complexing metals. *J Amer Chem Soc* 89:7017-2021.
2. Lewin R (1987) Chemistry in the image of biology. *Science* 238:611-612.
3. Lehn JM (1973) Structure and bonding, vol. 16, Springer Verlag, Berlín.
4. Potvin PG and Lehn JM (1987) in *Synthesis of Macrocycles: the design of selective complexing agents*. RM Izatt and JJ Christensen (eds), John Wiley and Sons, New York, p. 167-194.
5. Cram DJ (1983) Container molecules and their guests. *Science* 219:1177-1180.
6. Hosseini MW (1990) La catálisis supramolecular. *Mundo científico* 9:246-254.

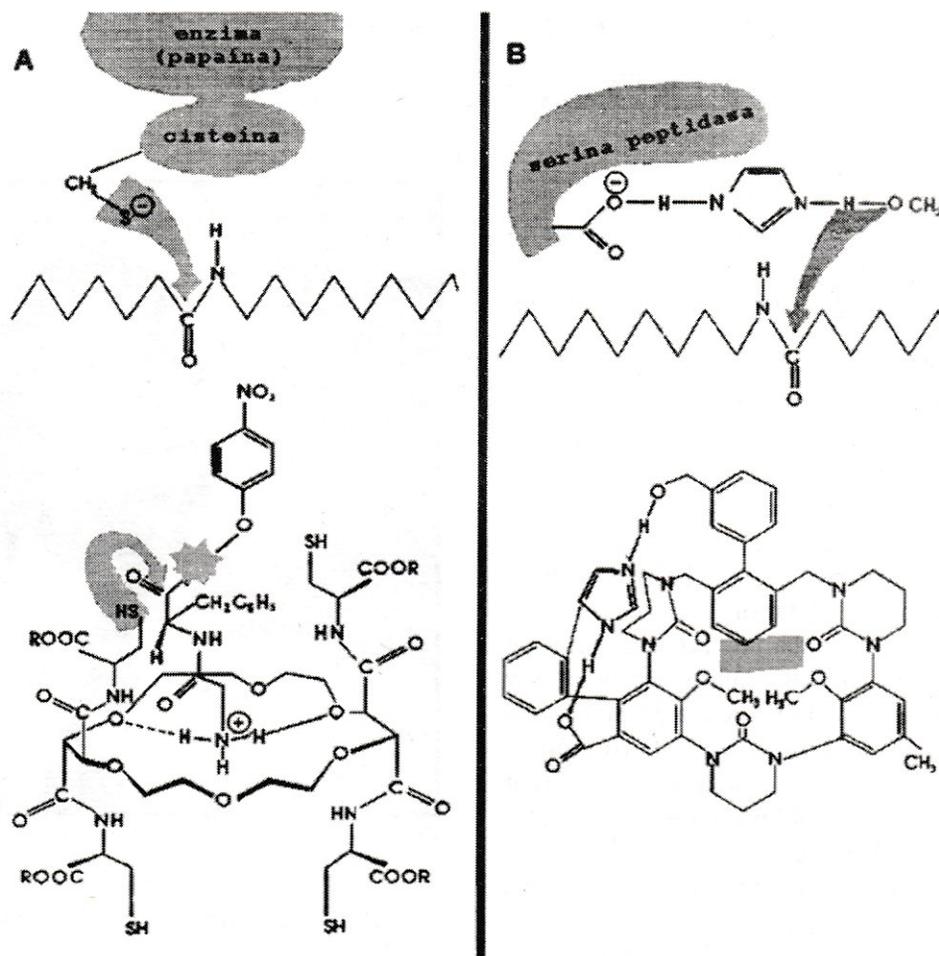


Figura 5. Esquema de las dos formas de crear peptidasas artificiales. Las peptidasas naturales son unas enzimas que degradan las proteínas convirtiéndolas en sus aminoácidos constitutivos. Lo hacen cortando el enlace peptídico (enlace $O = C-N-H$) que une los aminoácidos dos a dos. En **A** se representa la técnica adoptada por el equipo de J.-M. Lehn (4). En **B** se aprecia el enfoque del equipo de Cram (5). El mecanismo de la reacción de la parte superior derecha representa la acción de otra peptidasa, la serina peptidasa, sobre el enlace peptídico.

7. Ellaboudy A, Dye JL y Smith PB (1983) Cesium 18-crown-6 compounds. A crystalline ceside and a crystalline electride. *J Am Chem Soc* 105:6490-6491.
8. Dye JL, Yemen MR, DaGue MD and Lehn JM (1978) Optical spectra of alkali metal anion and 'Electride' films. *J Chem Phys* 68:1665-1670.
9. Dye JL y DeBacker MG (1987) Physical and chemical properties of alkaldes and electrides. *Ann Rev Phys Chem* 38:271-301.
10. Dye JL (1987) Electrides. *Sci Am* 257:58-57.
11. Gerardin L (1968) *La biónica* McGraw-Hill Book. Co. Madrid, p. 12.
12. Matisoo J (1980) El computador superconductor. *Investigación y Ciencia* 46:18-35.
13. Citado en S J Oh, Song KH, Whang D, and Kim K (1996) Catalytic hydrolysis of phosphate diesters by lanthanide (III) cryptate (2.2.1) complexes. *Inorg Chem* 35:3780.
14. Huang RH, Wagner MJ, Gilbert DJ, Reidy-Cedergren KA, Ward DL, Faber MK y Dye JL (1997) Structure and properties of Li^+ (cryptand[2.1.1]) e^- , an electride with a 1D "Spin-Ladder-Like" cavity-channel geometry *J Amer Chem Soc* 119:3765-3772.
15. Lopez E, Chypre C, Alpha B y Mathis G (1993) Europium (III) trisbipyridine cryptate label for time-resolved fluorescence detection of PCR products fixed on a solid support. *Clin Chem* 39:196-201.

OBITUARIO

LINO DÍAZ DE LEÓN

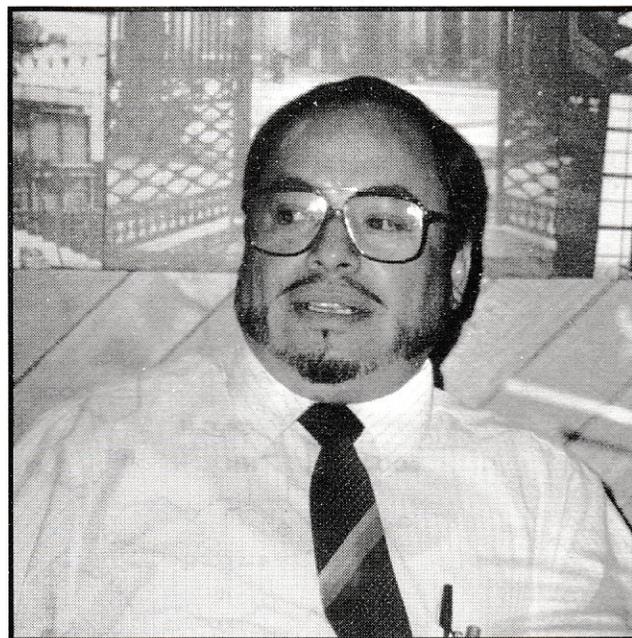
El pasado 16 de julio, murió nuestro entrañable colega y amigo, Lino Díaz de León, a consecuencia de un cáncer gástrico. Apenas una semana antes, se había producido el primer diagnóstico de malignidad que fue confirmado el lunes 12 en el Instituto Nacional de Cancerología; ese mismo día supimos que se trataba de un caso terminal. Su muerte nos sorprende y apesadumbra, fue un amigo de trato sencillo y sincero, un investigador sólido y productivo, así como un pilar del funcionamiento institucional de Biomédicas, durante al menos los últimos 12 años.

Conocí a Lino Díaz de León en 1974, siendo él estudiante doctoral en el laboratorio de Marcos Rojkind, mientras yo iniciaba mis prerrequisitos de maestría. Puesto que ambos éramos estudiantes y paisanos, nuestra relación fue cercana desde el principio y compartimos desde los juegos de frontón de mano hasta las tertulias en su casa de Correo Mayor 89 (atrás del Zócalo), atendidas amable y tolerantemente por su esposa Lourdes.

Lino obtuvo su título de Licenciatura en Química en 1970 en la Facultad de Química de la UNAM y su Doctorado en Ciencias con especialidad en Biología Celular en el CINVESTAV del IPN en 1975. Desarrolló su proyecto doctoral acerca de un tema que continuaría por muchos años: "Regulación de la biosíntesis de colágena en el hígado cirrótico". Partió inmediatamente a realizar dos estancias posdoctorales consecutivas durante cuatro años en los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América.

Regresó a México en 1979, convertido en el experto nacional en biosíntesis de proteínas *in vitro*, usando el sistema de reticulocitos y se estableció en el entonces Departamento de Biología del Desarrollo, como Investigador Titular "A", siendo promovido a Titular "B" en julio de 1992.

Siempre mantuvo su interés en el estudio del tejido conectivo, con un acento aplicado hacia la solución de problemas relacionados: cirrosis hepática, cicatrización, entre otros. Logró 35 publicaciones indizadas, dirigió dos tesis doctorales, 10 de maestría y 14 de licenciatura. Durante el último año fue promovido al nivel II en el SNI y había sido propuesto por la comisión evaluadora externa para nivel D en



Dr. Lino Díaz de León Hernández

el PRIDE. La muerte lo alcanza en una etapa de alta productividad científica.

Entre los cargos que desempeñó durante sus 25 años de labores en Biomédicas, se pueden mencionar el de Coordinador de Enseñanza 1985-1995, Secretario Académico 1989-1995 y Secretario de Programas de la Dirección 1995-1999. Fue también una vez integrante de la terna para elegir director del Instituto.

¡Descanse en paz!

Juan Pedro Laclette
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México

SEMBLANZA

El Dr. Lino Díaz de León Hernández nació en San Felipe Guanajuato el día 23 de septiembre de 1942 y falleció el día 16 de julio de 1999. Al querer escribir una remembranza del Dr. Lino forzosamente tengo que hacer una distinción entre el Lino que se dedicó a cargos académico-administrativos, del que se dedicó a la Investigación, del que fungió como asesor y

del Lino amigo. Desde mi personal punto de vista considero que en todos estos aspectos existió la honestidad, el respeto y la camaradería hacia el trabajo y hacia las personas.

El Dr. Lino entre otros cargos académico-administrativos fungió por 10 años (1985-1995) como Jefe de la Unidad de Enseñanza en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), coordinando la Licenciatura y Posgrado en Investigación Biomédica Básica UACPyP del CCH. De igual manera ocupó el cargo de Secretario Académico del IIB por 6 años (1989-1995) y de Secretario de Programas de la Dirección del IIB por 4 años (1995-1999). De manera que el Dr. Lino dedicó 14 años de su vida a funciones académico-administrativas del IIB. Durante todo este tiempo el Dr. Lino se distinguió por tener una gran comunicación ya sea con los investigadores, profesores, estudiantes, personal administrativo y en general con cualquier persona. Ante cualquier problema trató de ser mediador y de buscar diferentes instancias que los resolvieran. Esto generó la confianza de las personas para solicitar la asesoría y el apoyo del Dr. Lino. Esto seguramente le generó la amistad con muchas personas y el respeto de muchas otras.

En lo que se refiere al Lino que se dedicó a la investigación, él fue químico de formación y se inició en esta carrera bajo la dirección del Dr. Marcos Rojkind con quién hizo sus tesis de licenciatura y posgrado, obteniendo el grado de Doctor en 1975 en el CINVESTAV del IPN. En el mismo año inicio sus estancias postdoctorales en los Institutos Nacionales de la Salud (NIH por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos. A su regreso a México en 1979 se incorporó en el entonces Departamento de Biología del Desarrollo del IIB como pionero en México del sistema de "Traducción de proteínas *in vitro*". A partir de entonces inició la línea de Investigación que desarrolló por muchos años; "Metabolismo de la Colágena", utilizando como modelo experimental a hígados cirróticos. De igual manera, durante ese tiempo desarrolló un gran número de colaboraciones con diferentes investigadores tanto del IIB como fuera del mismo. De manera más reciente incursionó al estudio de los mecanismos celulares de cicatrización y fibrosis en piel. En esta línea se enfocó a evaluar la función del Fibroquel^{MR} y fungió como asesor científico de Aspid S. A. de C. V., laboratorio que elabora el Fibroquel^{MR}. Con dicho laboratorio y el PUIS y el PAIS firmó convenios de

investigación que se enfocaron a conocer la respuesta del Fibroquel^{MR} en cicatrices hipertróficas y queloides y sobre cultivos de sinovia de pacientes con artritis reumatoide. De igual manera, esta línea de investigación le permitió vincularse directamente con la clínica. Finalmente, el Dr. Lino también incursionó en los últimos años al terreno de la diferenciación celular y su relación con la matriz extracelular. Se enfocó a estudiar la expresión de las integrinas durante la diferenciación celular del cartílago, tanto en cartílago normal como en cartílago de fetos humanos con condrodisplasias.

El Dr. Lino desempeño otras actividades académicas muy importantes, esto es, fue miembro de comités de admisión al posgrado en diferentes programas. Fue tutor de 6 estudiantes de licenciatura, 31 de maestría y 22 de doctorado. Dirigió 14 tesis de licenciatura, 3 de especialidad, 10 de maestría y 2 de doctorado, quedando en proceso de finalización 2 tesis de licenciatura, 2 de maestría y 8 de doctorado. Esto generó la publicación de 55 artículos tanto en revistas y en libros de carácter internacional y nacional. Recientemente fue nombrado Investigador Nacional Nivel 2 del SNI y calificado como nivel D del PRIDE.

El Dr. Lino como asesor siempre tuvo la disposición de ayudar a los estudiantes sin importar el nivel académico que ellos tuvieran. En su laboratorio participó de manera muy amigable con todos y cada uno de los estudiantes y los diferentes técnicos académicos que tuvo bajo su dirección. Tuvo el interés de tratar de manera respetuosa y amigable a todos sus estudiantes, difícilmente se podría decir que alguien en su laboratorio no recibía apoyo de él. El Dr. Lino mostró conocimiento de las diferentes líneas que se desarrollaban en su laboratorio, y sin importar el gran número de estudiantes bajo su dirección y los diferentes cargos académico-administrativos que desempeñaba conocía los resultados de cada uno de ellos y en los seminarios de investigación de su grupo se "destrozaban" los resultados. Siempre permitió la fluidez de las ideas entre todos los miembros del laboratorio y la independencia en el trabajo experimental. Por otro lado, siempre quiso que su laboratorio fuera considerado como un grupo de trabajo dedicado al estudio del tejido conjuntivo, en donde se abordaban diferentes aspectos, tanto de desarrollo normal como patológico.

El Lino amigo tenía una faceta muy importante y es que siempre tenía la mejor disposición de entablar

una relación amistosa con cualquier persona, desde el personal de intendencia hasta el Director. Muchos son los amigos que le recuerdan en el Instituto y a todos ellos nunca les faltó un saludo de "buenos días" acompañado de una alegre sonrisa. De igual manera, en las reuniones del Instituto o del Departamento de Biología Celular o bien del laboratorio siempre se mostró con una actitud amistosa. Siempre mostró gran carácter y una actitud positiva en la vida, pocas fueron las ocasiones que no le vi sonreír. Recuerdo que aún dos días antes de su muerte le comenté a su médico que él haría su mejor esfuerzo para resistir el tratamiento y que caería con la frente en alto. Y así fue.

A la memoria del Maestro y Amigo escribí esta remembranza.

"Nuestra vida y nuestra muerte son la misma cosa. Cuando nos damos cuenta cabal de ello, le perdemos el miedo a la muerte y a las verdaderas dificultades de la vida"

Shunruyu Suzuki.

Dr Jesús Chimal Monroy
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México

A LA MEMORIA DE LA DOCTORA ADELA CUÉLLAR DE HERNÁNDEZ



Adela Cuéllar de Hernández

Adela Cuéllar de Hernández, Investigadora Titular "A" del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez", falleció el 29 de agosto de 1999. Entre las múltiples cualidades que reunía, su integridad, don de gentes, sen-

tido del humor, cultura y gran entusiasmo en todo lo que emprendía, le valieron la estima y el cariño de todos cuantos la conocimos. Su amistad y colaboración en distintos proyectos fue para muchos de nosotros un privilegio y un placer, por los que le quedaremos en deuda. Académicamente se distinguió por sus trabajos en el campo de la endocrinología y su relación con la bioenergética. El rigor que aplicaba a su trabajo experimental y su dedicación le hicieron merecedora del reconocimiento de pertenecer al Sistema Nacional de Investigadores. Su inagotable entusiasmo por la investigación la impulsó a continuar asistiendo al laboratorio a pesar de su grave enfermedad, que la obligó a retirarse sólo por algunos períodos, el último apenas un mes antes de ocurrir su deceso. La ausencia de una persona tan excepcional es sentida profundamente.

Sus compañeros investigadores del Departamento de Bioquímica.

• Edmundo Chávez Cosío
Instituto Nacional de Cardiología
"Dr Ignacio Chávez"

CÁTEDRA PATRIMONIAL DE EXCELENCIA NIVEL II

El programa de cátedras patrimoniales de excelencia nivel II fue establecido por el CONACyT para apoyar el desarrollo de grupos de investigadores en las instituciones públicas de los estados. Ante la decisión del CONACyT de terminar dicho programa, me he propuesto en la presente nota narrar mi experiencia en el ejercicio de una cátedra de ese tipo, deseando que sirva de referencia para evaluar la pertinencia de conservar este tipo de programas.

Entre mayo de 1997 y mayo de 1998, el CONACyT me otorgó una cátedra patrimonial nivel II para "el fortalecimiento del área bioquímica y de microbiología del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana". Este compromiso consistió concretamente en visitar una vez al mes, por cuatro días, al mencionado Instituto en Morelia, con el objetivo de interactuar con el personal académico y los estudiantes, apoyar los proyectos de investigación que se encontraban en desarrollo, establecer nuevas colaboraciones, impartir cursos y asistir a seminarios y exámenes tutorales de posgrado. En realidad, asistí regularmente de jueves a sábado la última semana de cada mes, aunque en tres ocasiones mi estancia fue de lunes a sábado debido a la impartición de cursos y a mi participación en la semana de investigación de la Universidad. El IIQB me asignó una oficina para mi uso exclusivo, lo cual facilitó mi trabajo académico. El estímulo económico por este trabajo consistió en un pago mensual de \$5,000, depositados puntualmente por el CONACyT en mi cuenta bancaria. Mis viáticos también fueron oportunamente cubiertos por la Universidad Michoacana, con fondos canalizados por el CONACyT a través de la SEP, para tal efecto.

Como resultado de esta interacción académica se inició un nuevo proyecto de investigación en colaboración con Carlos Cervantes, jefe del laboratorio de microbiología del IIQB. Aprovechando la experiencia y conocimiento de ambas partes en las áreas de biología molecular y bioenergética, enfocamos este proyecto hacia la determinación del mecanismo de acción de la proteína que confiere resistencia al cromo en *Pseudomonas*. Los experimentos fueron realizados por un estudiante tanto en el IIQB como en el Instituto Nacional de Cardiología (INC), quien pre-

sentó este trabajo como tesis para obtener el grado de maestro en ciencias de la Universidad Michoacana en agosto de 1999, y quien continuará su carrera científica ingresando al doctorado de la Universidad de Guanajuato. La tesis se realizó bajo la asesoría conjunta de C. Cervantes y el suscrito. Los resultados de este trabajo nos llevaron a concluir que la resistencia residía en un sistema de expulsión de cromo; estos datos se presentaron en el congreso de la American Society for Microbiology en mayo de 1999. Un artículo se preparó como resultado de este proyecto, el cual se envió para su evaluación al *Journal of Bacteriology* en julio de 1999. Esta actividad también nos permitió a C. Cervantes y a mí terminar de elaborar un libro sobre el impacto de la contaminación por metales pesados en los seres vivos, el cual ya apareció publicado por AGT Editor, S.A., en julio de 1999. Investigadores de las Universidades de Guanajuato y de San Luis Potosí y otros investigadores radicados en el D.F. participaron en la elaboración de los ocho capítulos de que consiste este libro.

La interacción con personal del área bioquímica resultó en la publicación de un artículo en *Biochemistry International* en 1997 con trabajo experimental desarrollado tanto en el IIQB como en mi laboratorio. También se produjeron cuatro comunicaciones a congresos nacionales y dos a congresos internacionales, con trabajo experimental de estudiantes del IIQB. Impartí tres cursos curriculares a los estudiantes de la maestría del IIQB sobre cinética enzimática y bioenergética. A raíz de esta continua interacción, tres estudiantes del IIQB decidieron continuar su formación científica en nuestro departamento de bioquímica en el INC; dos de ellos se encuentran actualmente cursando el tercer semestre de la maestría en ciencias de la Facultad de Ciencias, UNAM y una tercera ingresará próximamente al posgrado de la Facultad de Medicina, UNAM. También escribí, durante mis visitas al IIQB, un trabajo publicado en *Biochemical Pharmacology* en 1999 y una revisión sobre la fosforilación oxidativa que se publicó en el *Mensaje Bioquímico* en 1998, por lo cual aparecí en estos trabajos como autor perteneciente tanto al INC como al IIQB.

Mi cátedra no se pudo renovar debido a que el IIQB entregó la documentación al CONACyT unos días después de la fecha límite. Desde entonces no se ha vuelto a abrir la convocatoria para obtener cátedras patrimoniales nivel II. A pesar de que no todos los investigadores que gozaron de la cátedra cumplieron cabalmente con el compromiso académico, considero que el CONACyT debería mantener ese programa con el propósito de incrementar o continuar fortaleciendo los vínculos entre los investigado-

res del área metropolitana y las universidades de provincia los cuales. Esto contribuiría a la formación académica de muchos estudiantes y a acelerar el desarrollo de proyectos científicos que demandan la participación y colaboración de diversos grupos de trabajo.

Dr Rafael Moreno Sánchez
Departamento de Bioquímica del INC
Nivel 2 del SNI

COMENTARIOS SOBRE LIBROS DE RECIENTE PUBLICACIÓN

Contaminación Ambiental por Metales Pesados Impacto en los Seres Vivos

Carlos Cervantes y Rafael Moreno Sánchez
AGT, Editor, S.A. México, 1999
ISBN-968-463-093-X
De venta en las Librerías de Cristal
Precio al público: \$ 150.00 (M.N.)

Este libro es una compilación de capítulos que describe de una manera clara y concisa el conocimiento actual sobre las diversas formas por las cuales los metales interactúan con los seres vivos.

Esta obra analiza los efectos de los principales metales que se encuentran en el ambiente (plomo, cadmio, cromo, níquel y algunos otros), abordando hasta donde se conoce, la problemática actual de nuestro país con respecto a algunos de estos contaminantes. Los autores describen detalladamente tanto a nivel bioquímico como molecular, las diversas estrategias, como la tolerancia y la resistencia, que han desarrollado microorganismos de vida libre como las bacterias, las algas y hongos para poder sobrevivir en un ambiente cada día más contaminado con metales pesados. Sin embargo, los autores tocan tangencialmente la problemática de los efectos

sobre la salud humana ante la exposición a estos metales.

El texto presenta cómo el estudio de la tolerancia y la resistencia a este tipo de contaminación ha permitido generar el conocimiento suficiente para proponer diversas estrategias aplicables en la bioremediación de zonas contaminadas, tema que resulta especialmente importante en México, donde debido a la actividad presente y pasada de diversas industrias, se han generado zonas altamente contaminadas principalmente por metales pesados.

La manera en que los autores abordan un tema tan debatido y que genera tanta controversia como la contaminación ambiental por metales pesados, despierta interés tanto en expertos en la materia, como en investigadores y estudiantes de licenciatura y posgrado por comprender las dimensiones que este tipo de contaminación desencadena en el medio a corto y largo plazo.

Este libro será, sin duda, lectura obligada para todos aquellos que quieran adentrarse en un proceso tan comentado y tan poco comprendido como es el impacto de los metales pesados sobre los seres vivos.



Emilio Rojas del Castillo
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

PROBLEMA BIOQUÍMICO

TEMA: Cinética enzimática

Se determinó la actividad de la diadenosina polifosfato hidrolasa presente en las membranas plásmicas de las terminales presinápticas del órgano eléctrico de *Torpedo marmorata* (la raya eléctrica). Esta enzima tiene actividad de ectonucleotidasa, la cual se requiere para disminuir la acción de los dinucleótidos sobre receptores espe-

cíficos involucrados en la transmisión de señales. La actividad se midió con 0.1 mg de proteína a 37°C por el aumento en la fluorescencia que resulta de la hidrólisis del di-(1,N⁶-etenoadenosina) 5',5''-P¹,P³-polifosfato; al medio de reacción se añadió fosfatasa alcalina para evitar la inhibición por producto. A continuación se presentan las concentraciones de sustrato remanente a diferentes tiempos de iniciada la reacción.

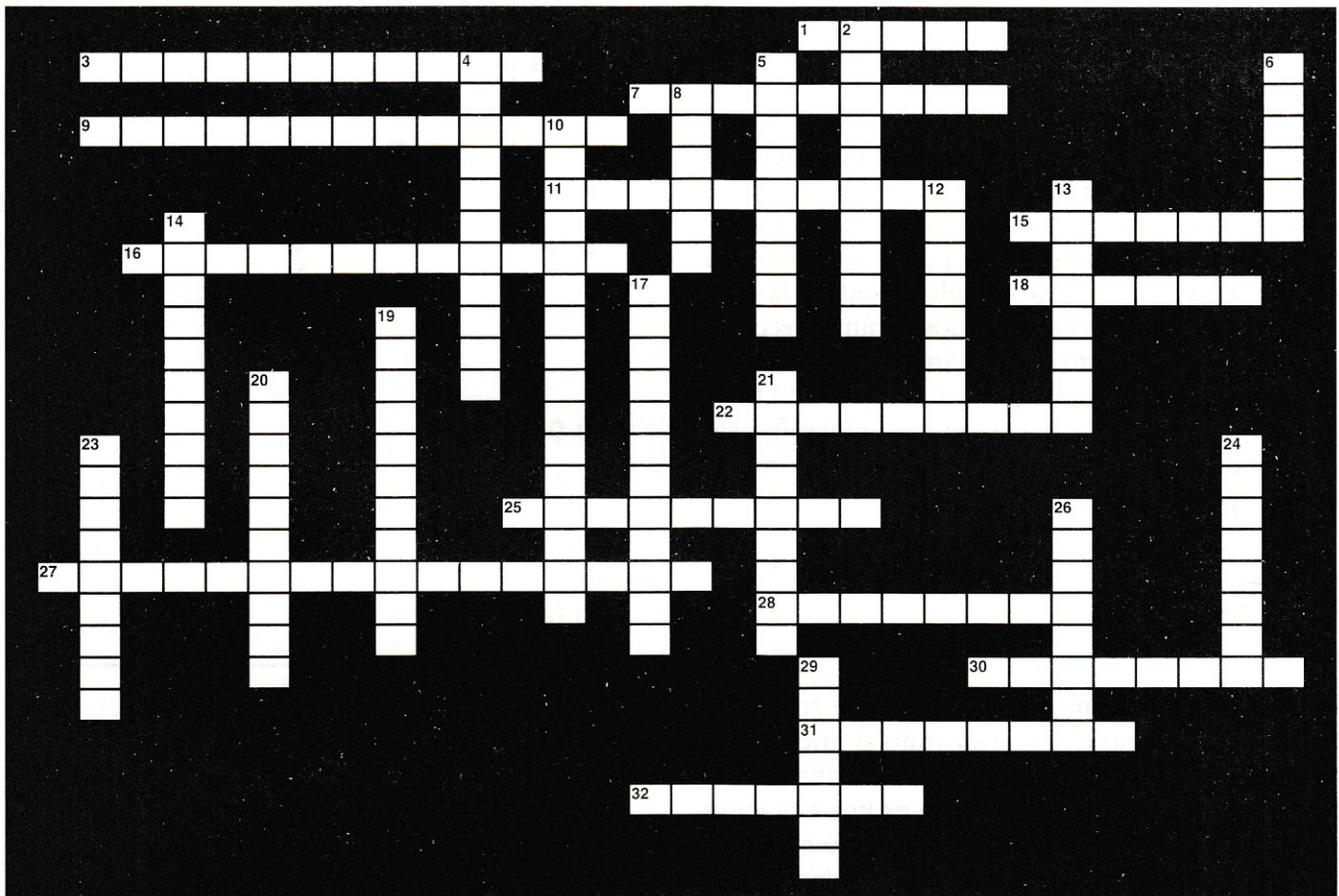
Tiempo, min	[S], μM
0	1.0
5	0.82
10	0.60
15	0.48
20	0.33
25	0.22
30	0.14
35	0.10
40	0.06

Determinar la K_s y la V_{max} .

CRUCIBIOQ

QUÍMICA DE PROTEÍNAS

Yolanda Saldaña Balmori



HORIZONTALES

1. Grupo funcional con nitrógeno, presente en todos los aminoácidos.
3. Unión que se establece entre los radicales no polares de los aminoácidos.
7. Aminoácido de cuatro átomos de carbono.
9. Se usa en la separación de moléculas y está constituida por una fase estacionaria y una móvil.
11. De estructura globular, participa en el almacenamiento de oxígeno en el músculo.
15. Iminoácido.
16. Aminoácido hidrófobo.
18. Aminoácido básico, que además de la arginina y la histidina tiene tres valores de pK.
22. Estructura mantenida por uniones tipo sal, van der Waals e interacción hidrofóbica.
25. En su cadena lateral tiene como grupo funcional al imidazol.
27. Se presente cuando hay alteración en la función biológica, por mutación de la hemoglobina.
28. Aminoácido que en su cadena lateral contiene azufre.
30. Aminoácido que no se puede sintetizar en humanos y se debe ingerir en la dieta.
31. Proteína que va de lado a lado de la membrana.
32. Reunión de varios aminoácidos de una manera ordenada.

VERTICALES

4. Presente en aquellas proteínas que tienen dos o más cadenas polipeptídicas.
5. Además del grupo amino se encuentra presente en todos los aminoácidos.
6. Aminoácido hidrofílico.
8. Investigador que determinó la estructura primaria de la insulina.
10. Anticuerpos participantes en los mecanismos de defensa.
12. Proteína que es responsable del 75% de la presión osmótica del plasma humano.
13. Aminoácido indispensable, tiene el grupo guanidino rico en nitrógeno.
14. La alfa-hélice y las placas plegadas caracterizan a esta estructura.
17. Valor de pH que se obtiene con el promedio de los valores de pK de sus grupos funcionales.
19. Transporta oxígeno.
20. Hormona derivada de un aminoácido, relacionada con receptores membranales.
21. Unión covalente que mantiene la estructura primaria de las proteínas.
23. Pueden ser fibrosas o globulares y tener función hormonal, estructural o catalítica.
24. Estructura dada por la secuencia de aminoácidos, determinada genéticamente.
26. Proteína muy abundante en los mamíferos, se encuentra en tendones, piel, dientes y huesos.
29. El aminoácido de peso molecular más bajo.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

RESPUESTA:

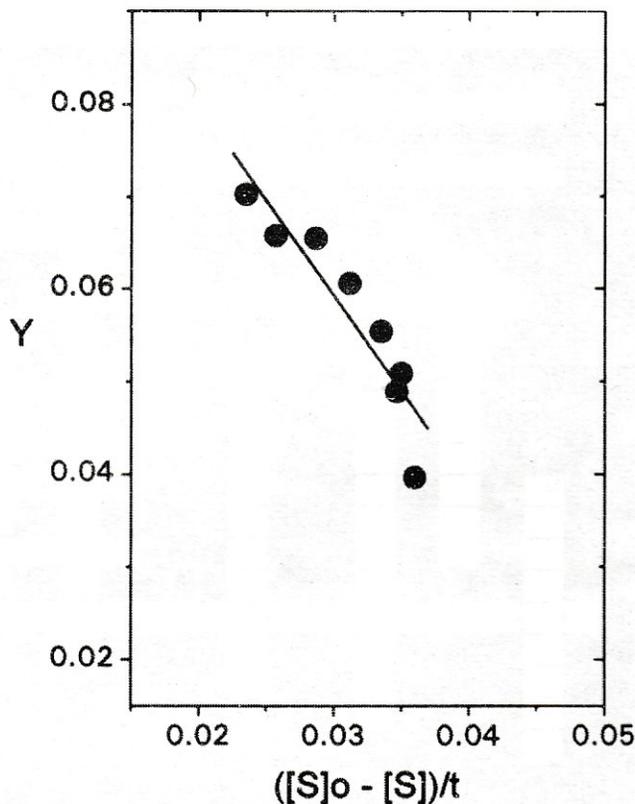
En algunas condiciones experimentales sólo se pueden realizar unos pocos ensayos de actividad, por ejemplo cuando la cantidad de material biológico o de sustrato es escasa y difícil de obtener o bien la medición de la desaparición de sustrato o de aparición de producto es muy laboriosa y costosa. En estas situaciones se puede recurrir a la ecuación integrada de Michaelis-Menten, la cual permite estimar los valores de los parámetros cinéticos con un solo trazo experimental (como ocurrió en este problema) y es válida sobre todo el curso temporal de la reacción; sin embargo, este procedimiento está obviamente sujeto a mayor error experimental. La fórmula es la siguiente:

$$\frac{2.303}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]} = - \frac{1}{K_s} \frac{([S]_0 - [S])}{t} + \frac{V_{max}}{K_s}$$

en donde **t** es el tiempo transcurrido de reacción, **[S]₀** es la concentración de sustrato al inicio de la reacción y **[S]** es la concentración de sustrato al tiempo **t**. Nótese que la fórmula es una ecuación de la recta ($y=mx+b$), con **y** siendo todo el término a la izquierda de la igualdad, **m** (la pendiente) es $-1/K_s$, **x** es la expresión $([S]_0 - [S])/t$ y el intercepto **b** es V_{max}/K_s .

Los valores para graficar son los siguientes:

(S ₀ - S)/t	(2.303/t) log (S ₀ /S)
0.03600	0.03966
0.03500	0.05090
0.03467	0.04892
0.03350	0.05541
0.03120	0.06056
0.02867	0.06549
0.02571	0.06580
0.02350	0.07025



El valor de la pendiente es de -2.05 , con lo cual la K_s tiene un valor de $0.48 \mu\text{M}$. El intercepto es igual a 0.12 , lo cual proporciona un valor para la V_{max} de $0.059 \mu\text{M min}^{-1}$; como el experimento se hizo con 0.1 mg de proteína, la V_{max} sería igual a $590 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, en cada litro de reacción.

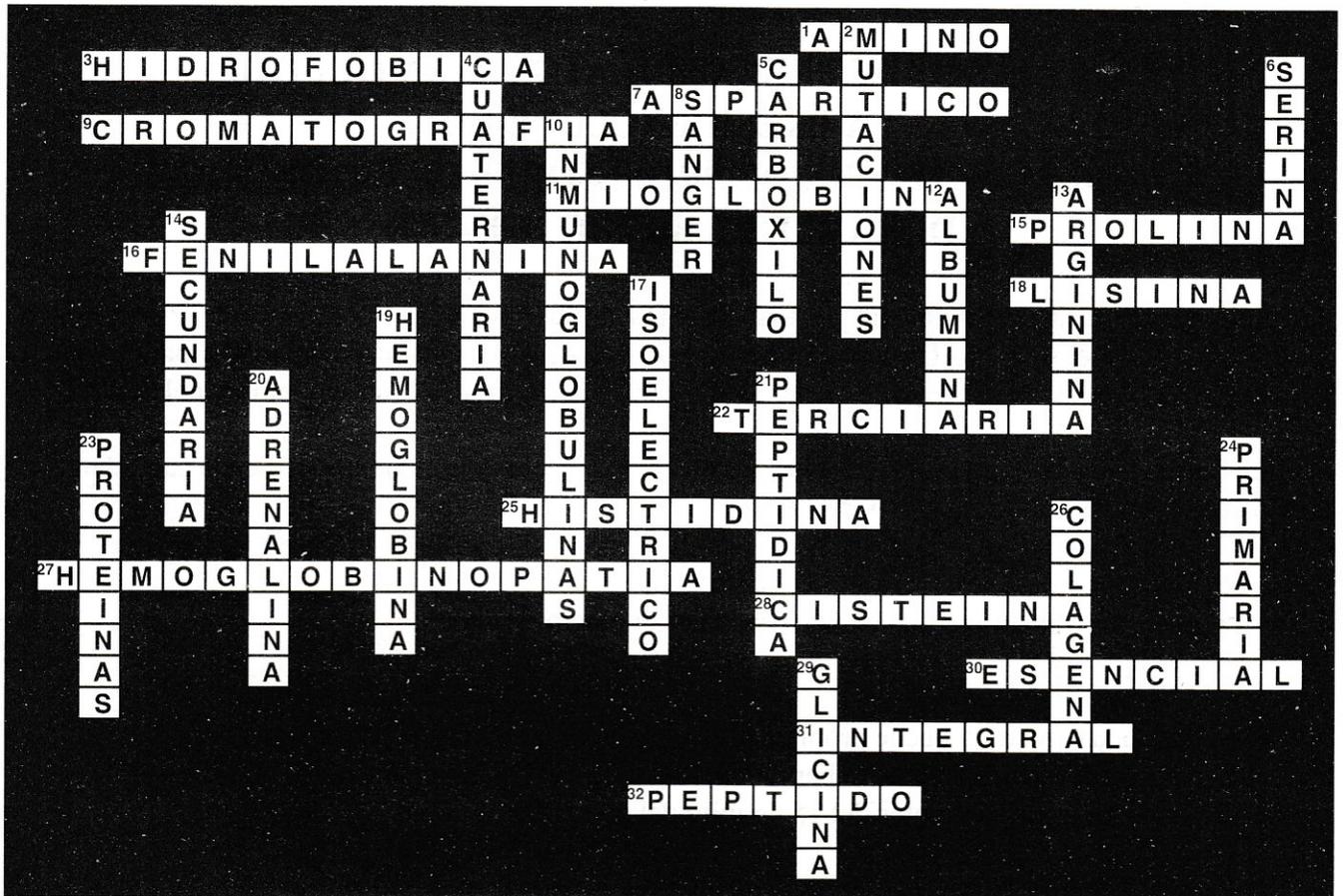
Bibliografía

Mateo J, Rotllan P, Marti E, Gómez de Aranda I, Solsona C, Miras-Portugal MT (1997) Diadenosine polyphosphate hydrolase from presynaptic plasma membranes of *Torpedo* electric organ. *Biochem. J.* 323, 667-684.
Segel IH (1975). *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons, New York. Cap. 2K, pp. 54-64.

Rafael Moreno Sánchez y Alicia Castillo

SOLUCIÓN:

CRUCIBIOQ



CONVOCATORIA

REGISTRO DE PRECANDIDATOS PARA OCUPAR LA PRESIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C DURANTE EL BIENIO 2000-2001

De acuerdo al artículo noveno de los estatutos de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C, el Consejo Directivo convoca a sus asociados a postular candidatos para ocupar la Presidencia de la Asociación durante el bienio 2000-2001, a partir del 1° de septiembre del año 2000.

Los candidatos deberán ser propuestos por escrito por asociados numerarios, y cada candidato postulado deberá entregar la siguiente documentación:

- Consentimiento por escrito para ser postulado.
- Proyecto de trabajo por dos años en caso de ser electo.
- Curriculum vitae.

Para que cada candidato quede propiamente registrado, las cartas de postulación de los asociados y la documentación de cada candidato deberá ser entregada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM antes del 15 de julio del año 2000.

De acuerdo al artículo décimo segundo de nuestros estatutos, el próximo presidente será elegido de la lista de candidatos generada por el Consejo Directivo de la Asociación. La elección del nuevo presidente se llevará a cabo durante la reunión de negocios del VIII Congreso de la Asociación programada para el mes de agosto del año 2000.

Ningún candidato podrá ser registrado después del 15 de julio del año 2000, después de lo cual el Consejo Directivo analizará todas las propuestas para generar la lista de candidatos elegibles durante la sesión regular de negocios de la Asociación que se realizará durante el VIII Congreso.

Entrega de documentos:

Sra Elisa Salles Mora
Cubículo 3,
Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina, UNAM
Ciudad Universitaria,
04510, México, DF. 04510
Tel: 56-23-21-70, Fax: 56-16-24-19
beb@laguna.fmeic.unam.mx

Dr Alejandro Zentella Dehesa
Laboratorio 204-Edificio Sur,
Departamento de Biología Celular,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Ciudad Universitaria,
04510, México, DF
Tel: 56-22-56-09, Fax: 56-22-56-11
azentell@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

CUOTAS PARA LA ACTUALIZACIÓN DE MEMBRESÍA Y ASISTENCIA AL VIII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C

Durante la sesión regular de negocios de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC (AMPB), realizada el 13 de agosto de 1999 en el Palacio de Medicina de la UNAM; el pleno fijó las siguientes cuotas para el año 2000:

MONTO DE LA CUOTA ANUAL

Asociados numerarios	\$300.00 (M.N.)
Asociados estudiantes	\$150.00 (M.N.)

Esta cuota permitirá recibir el BEB, asistir al VIII Congreso de la AMPB sin ningún pago adicional y participar en las sesiones de negocios, recibiendo una constancia de asistencia y/o de membresía. Durante la misma sesión se acordó que los asistentes al congreso que quieran estar inscritos formalmente, deberán pagar una inscripción de \$400.00 que les dará derecho a recibir una constancia de asistencia y/o participación durante el VIII Congreso de la AMPB.

FORMA DE PAGO: Deposite su pago a la cuenta Bancomer No. 1153813-9 llenando la ficha de depósito a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C. Escriba su nombre completo en la parte superior de la ficha de depósito anotando el concepto por el cual deposita (membresía 2000) y envíe por fax una copia de la ficha, junto con su forma de actualización (ver forma anexa). Si radica fuera de México comunicarse con el Dr Zentella para especificar la forma de pago. Durante el VI Congreso podrá canjear la ficha de depósito por un recibo oficial de la Asociación, por el pago de su cuota anual.

Enviar copia de ficha de depósito y forma de actualización vía fax a:

Sra Elisa Salles, al (5) 616-24-19, o al Dr Alejandro Zentella, al (5) 622-56-11.

INTERESADOS EN PERTENECER A LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C

Para quienes deseen formar parte de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A C (AMPB), les recordamos que de acuerdo al artículo 36° de los estatutos que rigen a la Asociación, los candidatos deberán ser profesionales que ejerzan la docencia de bioquímica en cualquier centro de educación a partir del nivel medio superior.

Los interesados en ser miembros numerarios de nuestra Asociación deberán enviar una carta solicitando su ingreso a la Asociación junto con su curriculum vitae. Esta solicitud deberá ir acompañada por dos cartas de apoyo de dos miembros numerarios. Cada solicitud será evaluada por la Comisión de admisión que se reúne una vez al año y emite su dictamen que será hecho público durante la sesión regular de negocios que se realiza durante el Congreso de la AMPB. Antes de ser aceptado no es necesario hacer pago alguno en referencia a la membresía.

Si no conoce a ningún miembro que pueda apoyar su solicitud háganoslo saber y envíe su solicitud al:

Dr Alejandro Zentella
Apartado Postal 70-243
México DF 04510 México
Fax: (5) 622-56-11
correo electrónico: azentell@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

A LOS LECTORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

DONATIVO ANUAL 1999

El BEB termina su décimo octavo año de publicación y debido a las condiciones económicas imperantes en México, nos permitimos solicitarles de la manera más atenta, el envío de un donativo extracuotas de \$ 200.00 (docientos pesos) o bien \$20.00 US dólares, que hará posible continuar con la elaboración y distribución del volumen 18 de nuestro Boletín.

El donativo puede hacerse mediante un depósito bancario a la cuenta número **1153813-9 de Bancomer**, o de un giro bancario a nombre de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C.

En espera de su comprensión y colaboración aprovechamos para enviarles un cordial saludo.

Atentamente
El Comité Editorial

¿TE INTERESARÍA SER CORRESPONSAL DEL BEB EN TU LOCALIDAD?

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A C o suscriptor del BEB y radicas fuera de la Ciudad de México o de su zona conurbada, TÚ PODRÍAS SER UN CORRESPONSAL DEL BEB. Nos gustaría contar con uno o varios corresponsales adscritos a las instituciones de Educación Superior de cada estado de la República Mexicana que nos permitan saber quiénes conforman la comunidad académica de la región y conocer las noticias y las actividades más relevantes que ocurran o vayan a ocurrir en su localidad o región (congresos, cursos, seminarios, necesidades de recursos humanos y materiales y otras noticias o acontecimientos de tipo académico). Queremos hacer extensiva esta invitación a nuestros colegas de Centro y Sudamérica, así como de otros países de habla hispana.

¿Te ha interesado esta invitación? Entonces envíanos tu propuesta directamente al Coordinador de Corresponsales, Comité Editorial del BEB, Apartado Postal 70-281, México 04510, D F, MÉXICO. O bien al Fax (525) 616 2419 o al correo electrónico sersan@servidor.unam.mx.

Atentamente
Sergio Sánchez Esquivel, Coord. de Corresponsales
del Comité Editorial del BEB

FORMA DE ACTUALIZACIÓN DE MEMBRESIA A LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C

Nombre completo: _____

Asociado: NUMERARIO ESTUDIANTE

Cuota cubierta: \$300 pesos \$150 pesos

Nombramiento: _____

Profesor de Bioquímica: SI NO

Otra materia: _____

Carrera en la que imparte clase: _____

ADSCRIPCIÓN

Departamento: _____

Facultad o escuela: _____

Universidad: _____

DIRECCIÓN DE LA INSTITUCIÓN

Calle y número: _____

Colonia: _____

Ciudad o estado: _____

Código postal: _____ Apartado postal: _____

Teléfono: () _____ - _____ - _____ , Fax: () _____ - _____ - _____

Correo electrónico: _____

DOMICILIO PARTICULAR

Calle y número: _____

Colonia: _____

Ciudad y estado: _____

Código postal: _____

Teléfono: () _____ - _____ - _____

ÍNDICE ANUAL DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 1999

AUTORES DE EDITORIALES

Calderón Salinas José Víctor y Zentella Dehesa Alejandro. Se inician y se reinician secciones en el BEB. BEB 18(2):51-52.

Reyes Méndez Jorge Joel. Hacia la sociedad del aprendizaje. BEB 18(3):95-97.

Zentella Dehesa Alejandro y Calderón Salinas José Víctor. Integración de nuevos miembros al Consejo Editorial del BEB. BEB 18(1):3-4.

Zentella Dehesa Alejandro y Calderón Salinas José Víctor. La revisión de manuscritos por investigadores con gran experiencia en el tema La revisión: la base de un buen trabajo editorial y la búsqueda de una revista cada vez más sólida. BEB 18(4):140-141.

AUTORES DE ARTÍCULOS

Becerril Flores Marco Antonio. La clonalidad de *Trypanosoma cruzi* y su relación con la enfermedad de Chagas. BEB 18(2):60-65.

Brambila Colombres Eduardo Miguel y Lozano Zaráin Patricia. Metalotioneínas, bioquímica y funciones propuestas. BEB 18(1):21-27.

Broche Valle Félix, Céspedes Miranda Ela M y García Piñeiro José C. Las proteínas de estrés en la biología molecular de la célula. BEB 18(3):98-107.

Delgadillo Gutiérrez Héctor Javier, Jarillo Soto Edgar, Domínguez Echeverría Patrizia y Berruecos Villalobos Luis. La enseñanza de la bioquímica en el sistema modular: una experiencia en el aula. BEB 18(3):118-124.

Flores-Herrera Oscar, Uribe Aída, Rendón Juan Luis, Pardo Juan Pablo y Martínez Federico. Análisis termodinámico del efecto de las mutaciones en el plegamiento de las proteínas. BEB 18(2):66-75.

González-Pedrajo Bertha y Dreyfus Georges. Motilidad, biogénesis flagelar y quimiotaxis bacteriana. BEB 18(4):142-152.

Higashida-Guerrero Carolina y Gutiérrez-Venegas Gloria. Lipopolisacáridos: extraordinarias moléculas activadoras de señales de transducción celular. BEB 18(1):28-35.

Ortega Raquel y Montiel Fernando. Transplante nuclear y clonación de organismos superiores. BEB 18(1):11-20.

Rangel Serrano Angeles. Función y propiedades bioquímicas de las proteínas G. BEB 18(2):53-59.

Reyes Méndez Jorge Joel. La ciencia a la zaga de la naturaleza. BEB 18(4):174-179.

Sánchez Linares Luis y Gavilanes Ruiz Marina. La elongación celular como un fenómeno asociado a la germinación en las semillas. BEB 18(1):5-10.

Vega Hernández Alfonso y Zaráin-Herzberg Angel. Factores transcripcionales que regulan la expresión genética en músculo. BEB 18(3):108-114.

Ventura Gallegos José Luis, Gómez González Erika Olivia y Zentella Dehesa Alejandro. Caspasas: una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis. BEB 18(4):153-165.

Zazueta Mendizábal Ana Cecilia. Transportadores de cationes en mitocondrias de mamíferos. BEB 18(4):166-173.

AUTORES DE OTRAS COMUNICACIONES

Calderón Salinas José Víctor. Un agradecimiento a la Sra Elisa Mora de Salles. BEB 18(1):38

Chávez Cosío Edmundo. A la memoria de la doctora Adela Cuéllar de Hernández. BEB 18(4):182.

Del Campo González José Gabriel. Hay que darle mayor crédito al origen extraterrestre de la vida. BEB 18(2):81.

Hernández Angeles Adriana. La falta de motivación como mecanismo de selección natural en el proceso de evolución dentro de los programas de posgrado. BEB 18(1):39-40.

Juárez Oropeza Marco Antonio. Del Buen Decir. BEB 18(2):76-77.

Laclette Juan Pedro y Chimal Monroy Jesús. Lino Díaz de León. Obituario. BEB 18(4):180-182.

López Bojórquez Lucia Nikolaia. Las bases moleculares de la percepción del picante o la identificación y caracterización del receptor de la capsaicina. BEB 18(3):125-127.

Moreno Sánchez Rafael. Cátedra patrimonial de excelencia. Nivel II. BEB 18(4):183-184.

Moreno Sánchez Rafael. Problema Bioquímico Bioenergética. BEB 18(2):79.

Moreno Sánchez Rafael y Castillo Alicia. Problema Bioquímico. Cinética enzimática. BEB 18(4):186.

Moreno Sánchez Rafael y Castillo Alicia. Respuesta al Problema Bioquímico. Cinética enzimática. BEB 18(4):189.

Ortiz Jiménez Marco Antonio. La colección de microorganismos de interés en las ciencias biomédicas. BEB 18(2):78-79.

Rodríguez Enríquez Sara y Moreno Sánchez Rafael. Problema Bioquímico. Bioenergética. BEB 18(3):128.

Rojas del Castillo Emilio. Comentarios sobre libros de reciente publicación. 18(4):185.

Saldaña Balmori Yolanda. CRUCIBIOQ. BEB 18(3):129.

Saldaña Balmori Yolanda. CRUCIBIOQ. BEB 18(4):187.

Saldaña Balmori Yolanda. Solución al CRUCIBIOQ. BEB 18(4):188.

Zentella Dehesa Alejandro. Biología funcional de los animales. Comentario sobre el libro. BEB 18(1):36-37.

Zentella Dehesa Alejandro. Biología molecular en medicina. Comentario sobre el libro. BEB 18(2):82.

TÍTULOS DE EDITORIALES

Hacia la Sociedad del Aprendizaje. Reyes Méndez Jorge Joel. BEB 18(3):95-97.

Integración de nuevos miembros al Consejo Editorial del BEB. Zentella Dehesa Alejandro y Calderón Salinas José Víctor. BEB 18(1):3-4.

La revisión de manuscritos por investigadores con gran experiencia en el tema La revisión: la base de un buen trabajo editorial y la búsqueda de una revista cada vez más sólida. Zentella Dehesa Alejandro y Calderón Salinas José Víctor. BEB 18(4):140-141.

Se inician y se reinician secciones en el BEB. Calderón Salinas José Víctor y Zentella Dehesa Alejandro. BEB 18(2):51-52.

TÍTULOS DE ARTÍCULOS

Análisis termodinámico del efecto de las mutaciones en el plegamiento de las proteínas. Flores-Herrera Oscar, Uribe Aída, Rendón Juan Luis, Pardo Juan Pablo y Martínez Federico. BEB 18(2):66-75.

Caspasas: una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis. Ventura Gallegos José Luis, Gómez González Erika Olivia y Zentella Dehesa Alejandro. BEB 18(4):153-165.

Factores transcripcionales que regulan la expresión genética en músculo. Vega Hernández Alfonso y Zaráin-Herzberg Angel. BEB 18(3):108-114.

Función y propiedades bioquímicas de las proteínas G. Rangel Serrano Angeles. BEB 18(2):53-59.

La ciencia a la zaga de la naturaleza. Reyes Méndez Jorge Joel. BEB 18(4):174-179.

La clonalidad de *Trypanosoma cruzi* y su relación con la enfermedad de Chagas. Becerril Flores Marco Antonio. BEB 18(2):60-65.

La elongación celular como un fenómeno asociado a la germinación en las semillas. Sánchez Linares Luis y Gavilanes Ruiz Marina. BEB 18(1):5-10.

La enseñanza de la bioquímica en el sistema modular: una experiencia en el aula. Delgadillo Gutiérrez Héctor Javier, Jarillo Soto Edgar, Domínguez Echeverría Patrizia y Berruecos Villalobos Luis. BEB 18(3):118-124.

Las proteínas de estrés en la biología molecular de la célula. Broche Valle Félix, Céspedes Miranda Ela M y García Piñeiro José C. BEB 18(3):98-107.

Lipopolisacáridos: extraordinarias moléculas activadoras de señales de transducción celular. Higashida-Guerrero Carolina y Gutiérrez-Venegas Gloria. BEB 18(1):28-35.

Metalotioneínas, bioquímica y funciones propuestas. Brambila Colombres Eduardo Miguel y Lozano Zaráin Patricia. BEB 18(1):21-27.

Motilidad, biogénesis flagelar y quimiotaxis bacteriana. González-Pedrajo Bertha y Dreyfus Georges. BEB 18(4):142-152.

Transplante nuclear y clonación de organismos superiores. Ortega Raquel y Montiel Fernando. BEB 18(1):11-20.

Transportadores de cationes en mitocondrias de mamíferos. Zazueta Mendizábal Ana Cecilia. BEB 18(4):166-173.

TÍTULOS DE OTRAS COMUNICACIONES

Biología funcional de los animales. Comentario sobre el libro. Zentella Dehesa Alejandro. BEB 18(1):36-37.

Biología molecular en medicina. Comentario sobre el libro. Zentella Dehesa Alejandro. BEB 18(2):82.

Cátedra patrimonial de excelencia. Nivel II. Moreno Sánchez Rafael. BEB 18(4):183-184.

Comentarios sobre libros de reciente publicación. Rojas del Castillo Alejandro. BEB 18(4):185

CRUCIBIOQ. Saldaña Balmori Yolanda. BEB 18(3):129.

CRUCIBIOQ. Saldaña Balmori Yolanda. BEB 18(4):187.

CRUCIBIOQ, Solución al. Saldaña Balmori Yolanda. BEB 18(4):189.

Del Buen Decir. Juárez Oropeza Marco Antonio. BEB 18(2):76-77.

Hay que darle mayor crédito al origen extraterrestre de la vida. Del Campo González José Gabriel. BEB 18(2):81.

A la memoria de la doctora Adela Cuéllar de Hernández. Chávez Cosío Edmundo. BEB 18(4):182.

La falta de motivación como mecanismo de selección natural en el proceso de evolución dentro de los programas de posgrado. Hernández Angeles Adriana. BEB 18(1):39-40.

Las bases moleculares de la percepción del picante o la identificación y caracterización del receptor de la capsaicina. López Bojórquez Lucia Nikolaia. BEB 18(3):125-127.

La colección de microorganismos de interés en las ciencias biomédicas. Ortiz Jiménez Marco Antonio. BEB 18(2):78-79.

Lino Díaz de León. Obituario. Laclette Juan Pedro y Chimal Monroy Jesús. BEB 18(4):180-182.

Problema Bioquímico. Bioenergética. Moreno Sánchez Rafael. BEB 18(2):79.

Problema Bioquímico. Bioenergética. Rodríguez Enríquez Sara y Moreno Sánchez Rafael. BEB 18(3):128.

Problema Bioquímico. Cinética enzimática. Moreno Sánchez Rafael y Castillo Alicia. BEB 18(4):186.

Problema Bioquímico, Respuesta al. Cinética enzimática. Moreno Sánchez Rafael y Castillo Alicia. BEB 18(4):188.

Un agradecimiento a la Sra Elisa Mora de Salles. Calderón Salinas José Víctor. BEB 18(1):38.

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

El BEB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y de áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea clara y explícita. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Se solicita a los autores que se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 1) El artículo deberá enviarse en un disco para computadora, escrito en los procesadores de textos "Winword" o "Word-perfect", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 caracteres por renglón). Éste deberá ir acompañado de tres impresiones del artículo y de la solicitud para su publicación, firmada por cada uno de los autores.
- 2) El trabajo debe iniciarse con el título del artículo, nombre de los autores, iniciando por nombre propio completo y marcado como pie de nota, la afiliación del o los autores (por ejemplo: departamento e institución), domicilio, código postal, ciudad, estado, país, teléfono, fax y correo electrónico en caso de tenerlos. Si el título del trabajo es largo, debe incluirse cuatro renglones más abajo, un título breve con un máximo de 60 caracteres, incluyendo los espacios, para insertarlo como cabeza de página.
- 3) Se deberá incluir un resumen en idioma español y uno en inglés, de más o menos diez renglones, que irán seguidos por conjuntos de tres a seis palabras clave.
- 4) Se sugiere un máximo de quince referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas entre paréntesis en el texto de forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada una debe contener: nombres de los autores, año de publicación entre paréntesis, título del artículo, nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen en cursivas y antecedido por dos puntos el número de la primera y últimas páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:

Fraga C G y Oteiza P I (1995) Vitaminas antioxidantes: Bioquímica, Nutrición y participación en la prevención de ciertas patologías. *Bol Educ Bioq* 14:12-17.

Weindruch R (1996) Caloric restriction and aging. *Sci Amer* 274:32-38.

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood K J (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The molecular biology of immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Willey and Sons Ltd, pp 81-104.

Los libros se citarán de acuerdo con este ejemplo y podrán incluir las páginas totales o las consultadas:

Lehninger A L, Nelson D L y Cox M M (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 5) Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, figuras más tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o bien impresiones láser o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya localización deberá estar señalada en el texto. La limitación en el número de figuras, de tablas y de referencias, obliga a los autores a que se seleccionen aquellas que sean realmente importantes e informativas. Las figuras se deberán numerar con arábigos y las tablas con romanos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán adicionar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán de tamaño, aproximadamente a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores a los dos milímetros. Las tablas se deberán presentar conforme alguna de las publicadas en los números de 1998.
- 6) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.
- 7) Se recomienda revisar los números recientes para familiarizarse con el estilo de la revista.

II. OTRAS COMUNICACIONES

- 1) El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo, etcétera.
- 2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita:
- 3) El trabajo deberá enviarse igual que como se especifica en el inciso I-1.
- 4) Se aceptará un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto según el inciso I-4. En caso de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla, de acuerdo con las características que se indican en el inciso I-5.

Los manuscritos serán leídos por tres revisores. Las correcciones y sugerencias, así como las pruebas de página se enviarán al primer autor. En caso necesario se recurrirá a revisores externos al Comité Editorial.

El disco y las tres copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal del BEB en su localidad.

CONTENIDO

EDITORIAL

LA REVISIÓN DE MANUSCRITOS POR INVESTIGADORES CON GRAN EXPERIENCIA EN EL TEMA LA REVISIÓN: LA BASE DE UN BUEN TRABAJO EDITORIAL Y LA BÚSQUEDA DE UNA REVISTA CADA VEZ MÁS SÓLIDA
Alejandro Zentella Dehesa
y José Víctor Calderón Salinas 140

ARTÍCULOS

MOTILIDAD, BIOGÉNESIS FLAGELAR Y QUIMIOTAXIS BACTERIANA
Bertha González-Pedrajo
y Georges Dreyfus 142

CASPASAS: UNA CASCADA DE PROTEASAS IMPLICADAS EN LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS
José Luis Ventura Gallegos, Erika Olivia Gómez
González y Alejandro Zentella Dehesa 153

TRANSPORTADORES DE CATIONES EN MITOCONDRIAS DE MAMÍFEROS
Ana Cecilia Zazueta Mendizábal 166

LA CIENCIA A LA ZAGA DE LA NATURALEZA
Jorge Joel Reyes Méndez 174

OTRAS COMUNICACIONES

OBITUARIO. LINO DÍAZ DE LEÓN
Juan Pedro Laclette y Jesús Chimal Monroy 180

A LA MEMORIA DE LA DOCTORA ADELA CUÉLLAR DE HERNÁNDEZ
Edmundo Chávez Cosío 182

CÁTEDRA PATRIMONIAL DE EXCELENCIA. NIVEL II
Rafael Moreno Sánchez 183

COMENTARIOS SOBRE LIBROS DE RECIENTE PUBLICACIÓN
Emilio Rojas del Castillo 185

PROBLEMA BIOQUÍMICO
Rafael Moreno Sánchez y Alicia Castillo 186

CRUCIBIOQ
Yolanda Saldaña Balmori 187

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO
Rafael Moreno Sánchez y Alicia Castillo 188

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
Yolanda Saldaña Balmori 189

CONVOCATORIAS

REGISTRO DE PRECANDIDATOS PARA OCUPAR LA PRESIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C, DURANTE EL BIENIO 2000-2001 190

CUOTAS PARA LA ACTUALIZACIÓN DE MEMBRESÍA Y ASISTENCIA AL VIII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C 191

INTERESADOS EN PERTENECER A LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C 192

A LOS LECTORES DEL BEB
Donativo Anual 1999 192

¿TE INTERESARÍA SER CORRESPONSAL DEL BEB EN TU LOCALIDAD? 192

FORMA DE ACTUALIZACIÓN DE MEMBRESÍA A LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C 193

ÍNDICE ANUAL DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 194

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 198